



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN VITICOLTURA ED ENOLOGIA

# **Impatto di metodi di coltivazione di *Oenococcus oeni* sulla fermentazione malolattica**

Tesi di laurea in MICROBIOLOGIA ENOLOGICA

Relatore

Prof. Davide Gottardi

Correlatori:

Dott.ssa Margherita D'Alessandro

Prof.ssa Giuseppina Paola Parpinello

Dott. Cristian Alexis Galaz Torres

Presentata da

Sofia Zoppellari

---

Sessione luglio 2024

Anno Accademico 2023/2024

# SOMMARIO

<b>CAPITOLO 1 - La fermentazione malolattica e la sua importanza nel settore enologico.....</b>	<b>1</b>
1.1 La fermentazione malolattica in enologia.....	1
1.2 Ruolo della Fermentazione Malolattica nei Vini Rossi e Bianchi .....	2
1.2.1 Vini Rossi.....	2
1.2.2 Vini Bianchi .....	2
<b>CAPITOLO 2 – I batteri lattici e il loro metabolismo.....</b>	<b>4</b>
2.1 Caratteri generali e tassonomia dei batteri lattici d’interesse enologico.....	4
2.1.1 Caratteristiche principali.....	4
2.1.2 Tassonomia e classificazione .....	4
2.2 Principali vie metaboliche dei LAB.....	7
2.2.1 Metabolismo dei carboidrati .....	7
2.2.2 Metabolismo dell’acido citrico .....	8
2.2.3 Metabolismo dei composti azotati .....	9
2.2.4 Fermentazione malolattica (FML).....	10
2.3 Influenza complessiva del metabolismo dei LAB sul vino .....	11
2.3.1 Sintesi e idrolisi di esteri.....	12
2.3.2 Attività glucosidasi.....	12
2.3.3 Metabolismo dell’acetaldeide .....	12
2.3.4 Aumento dell’acidità volatile.....	13
2.3.5 Produzione di sostanze acetoiniche .....	13
2.3.6 Formazione di etilcarbammato .....	14
2.3.7 Produzione di ammine biogene.....	14
2.3.8 Degradazione del glicerolo .....	15
2.3.9 Fenoli volatili.....	16
<b>CAPITOLO 3 - Fattori chimico-fisici che influenzano lo sviluppo e il metabolismo dei LAB</b>	<b>17</b>

3.1 pH.....	17
3.2 Anidride solforosa.....	17
3.3 Etanolo .....	18
3.4 Temperatura .....	18
3.5 Fattori secondari.....	18
<b>CAPITOLO 4 - Evoluzione dei LAB durante la vinificazione e interazioni con altri microrganismi .....</b>	<b>20</b>
<b>CAPITOLO 5 - Uso di starter per la fermentazione malolattica .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Caratteri di selezione degli starter malolattici .....</b>	<b>24</b>
5.2 Modalità d'inoculo di batteri lattici .....	25
5.2.1 Co-inoculo.....	25
5.2.2 Inoculo sequenziale.....	27
<b>CAPITOLO 6 – Scopo della tesi.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPITOLO 7 – Materiali e metodi.....</b>	<b>29</b>
7.1 Microrganismi utilizzati e condizioni di crescita.....	29
7.2 Preparazione del mosto sintetico .....	29
7.3 Fermentazione alcolica e inoculo di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31
7.4 Fermentazione malolattica e inoculo di <i>Oenococcus oeni</i> .....	32
7.5 Analisi microbiologiche .....	33
7.6 Analisi chimiche.....	33
7.7 Analisi statistica .....	33
<b>CAPITOLO 8 – Risultati.....</b>	<b>35</b>
8.1 Fermentazione alcolica .....	35
8.2 Preadattamento di <i>Oenococcus oeni</i> a diversi pH.....	36
8.3 Fermentazione malolattica .....	37
<b>CAPITOLO 9 – Conclusioni .....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>

# **CAPITOLO 1 - La fermentazione malolattica e la sua importanza nel settore enologico**

## **1.1 La fermentazione malolattica in enologia**

Il vino è “il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione alcolica totale o parziale di uve fresche, pigiate o no, o di mosti di uve” (allegato I del regolamento (CE) n. 1493/99). Tuttavia, la maturazione di certi tipi di vini deve andare incontro ad un altro processo metabolico portato avanti dai batteri lattici: la fermentazione malolattica (FML). La FML è un processo metabolico cruciale nella vinificazione, noto anche come disacidificazione biologica del vino. Questo processo è stato studiato approfonditamente a partire dal 1922 con Ferré e, successivamente, negli anni '30 con Ribéreau-Gayon che ne hanno dimostrato l'importanza nella produzione del vino. Durante la FML, i batteri lattici trasformano l'acido L-malico, un acido dicarbossilico presente nell'uva, in acido L-lattico, un acido monocarbossilico, e anidride carbonica. Questo processo non solo aumenta il pH del vino (circa 0,1-0,5 unità), ma contribuisce anche ad ammorbidirlo, riducendo la sua acidità. La disacidificazione biologica può essere utilizzata per standardizzare la qualità di vini di annate diverse, con contenuti variabili di acido malico a seconda della varietà di uve e delle condizioni climatiche dell'annata (Coetzee, 2013; Lakso e Kliever, 1975). In paesi con climi più freddi, la diminuzione di acidità è particolarmente rilevante, mentre in regioni più calde, dove l'acido malico nelle uve è meno concentrato, il cambiamento nel profilo sensoriale del vino diventa più significativo (Lerm et. al 2010). Il miglioramento delle caratteristiche organolettiche del vino attraverso la FML è ben documentato. La sostituzione del sapore duro dell'acido malico con quello più morbido dell'acido lattico e la formazione di composti aromatici, come il lattato di etile, contribuiscono a conferire al vino una sensazione di volume e complessità aromatica (Henlick-Kling, 1992). La produzione o degradazione di composti chimici da parte dei batteri lattici durante la FML aggiungono ulteriori note aromatiche, migliorando il profilo sensoriale del vino.

Inoltre, la FML può anche essere utilizzata come strumento di bioprotezione migliorando la qualità e la salubrità del vino. Infatti, il completo consumo degli zuccheri rimasti dalla fermentazione alcolica può prevenire lo sviluppo di lieviti, come *Schizosaccharomyces pombe*

(Petruzzi et al., 2017), o altri batteri lattici che andrebbero a causare fermentazioni indesiderate in bottiglia. Allo stesso tempo, però, una fermentazione malolattica non controllata può andare ad aumentare il rischio di avere un prodotto di minore qualità e salubrità per l'aumento dell'acidità volatile, la formazione di anidride carbonica (Pardo e Ferrer, 2021), amine biogene (Costantini et al., 2019) ed etilcarbammato (Liu, 2002).

## **1.2 Ruolo della Fermentazione Malolattica nei Vini Rossi e Bianchi**

### **1.2.1 Vini Rossi**

La FML è una tappa fondamentale nella produzione dei vini rossi, in particolare per quelli da invecchiamento. Questo processo rende i vini rossi più morbidi, vellutati e corposi, migliorando complessivamente le loro caratteristiche organolettiche. La trasformazione dell'acido malico in acido lattico aiuta a smorzare il sapore duro dell'acido malico, che altrimenti non si accorderebbe con l'astringenza dei tannini. Nei vini rossi giovani, la FML contribuisce ad aumentare la complessità aromatica, rendendo il profilo sensoriale del vino più completo e interessante.

### **1.2.2 Vini Bianchi**

Tradizionalmente, la FML non era considerata una tappa convenzionale nella vinificazione dei vini bianchi. Tuttavia, veniva occasionalmente impiegata per disacidificare vini bianchi molto acidi o per valorizzare l'espressione aromatica di alcuni vitigni adatti all'invecchiamento e vinificati in fusti di legno, come ad esempio Chardonnay (secondo il modello di vinificazione tradizionale borgognona). I vini bianchi sono generalmente apprezzati per la loro acidità e freschezza, quindi un calo di acidità dovuto alla FML potrebbe essere considerato deleterio. Inoltre, le modifiche dell'aroma legate all'azione dei batteri lattici potrebbero non armonizzarsi con tutti i vitigni e stili di vinificazione, come nel caso dei vini da varietà aromatiche come Gewürztraminer, dove la FML potrebbe mascherare gli aromi caratteristici (Pardo e Ferrer, 2021). Recentemente, tuttavia, vi è una crescente tendenza a utilizzare la FML per creare nuovi vini bianchi con caratteristiche distintive (Pardo e Ferrer, 2021). Ad esempio, Knoll et al. (2011) hanno dimostrato come la FML effettuata su Riesling e Chardonnay può incrementare l'aroma legato agli esteri fruttati, mostrando un'influenza positiva sul profilo aromatico del vino. Anche

una FML parziale, senza la totale conversione dell'acido malico, può apportare benefici aromatici mantenendo la freschezza desiderata nei vini bianchi.

In conclusione, la FML è un processo essenziale nel settore enologico, con un impatto significativo sia sui vini rossi che sui vini bianchi, migliorandone la qualità e contribuendo alla diversificazione dei profili aromatici.

## **CAPITOLO 2 – I batteri lattici e il loro metabolismo**

### **2.1 Caratteri generali e tassonomia dei batteri lattici d'interesse enologico**

#### **2.1.1 Caratteristiche principali**

I batteri lattici (LAB) sono microrganismi ubiquitari accomunati dalla produzione di acido lattico come prodotto principale del loro metabolismo. I caratteri generali dei LAB comprendono l'essere batteri Gram-positivi, non mobili, non sporigeni, catalasi-negativi (anche se alcuni possono presentare attività pseudo-catalasica) e microaerofili, di conseguenza tollerano la presenza di ossigeno, senza però utilizzarlo nei processi metabolici, che sono prevalentemente fermentativi. Sono chemiotrofi cioè in grado di ottenere energia dall'ossidazione di composti chimici e molto esigenti dal punto di vista nutrizionale, specialmente per quanto riguarda le fonti vitaminiche e azotate.

I LAB sono sempre presenti nei mosti e nei vini dove, in base alle condizioni del mezzo, possono svilupparsi o meno. Nel caso in cui i LAB trovino condizioni favorevoli alla crescita, sono in grado di metabolizzare una vasta gamma di composti chimici presenti nel mosto/vino. La loro importanza nel settore enologico è dovuta alla capacità di eseguire la FML. Tuttavia, in certe condizioni possono essere anche fonte di alterazione provocando il decadimento della qualità del vino. Di conseguenza, la natura e la concentrazione dei prodotti del loro metabolismo vanno complessivamente ad impattare, in modo positivo o negativo, la qualità organolettica e la salubrità del vino in base a: la specie di LAB presente, i substrati disponibili, e la loro interazione con altri microrganismi.

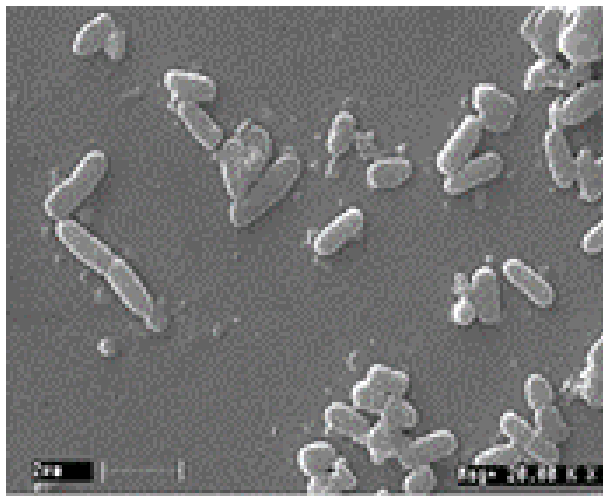
#### **2.1.2 Tassonomia e classificazione**

I LAB appartengono al dominio *Bacteria* e al phylum *Firmicutes*. Sebbene siano presenti diversi generi e diverse famiglie, solo alcune di esse sono in grado di sviluppare nel mosto/vino, date le sue condizioni abbastanza restrittive (presenza di etanolo, SO<sub>2</sub>, basso pH e limitata disponibilità di nutrienti). Data l'eterogeneità dei LAB, la loro morfologia può variare da bastoncelli a cocchi. Dal punto di vista metabolico si dividono in omofermentanti ed eterofermentanti. Gli omofermentanti sono in grado di fermentare solo gli esosi, trasformandoli principalmente (oltre l'85%) in acido lattico. Gli eterofermentanti, invece, sono in grado di fermentare sia esosi che

pentosi, convertendoli in acido lattico e altri prodotti quali CO<sub>2</sub>, acido lattico, etanolo e/o acido acetico.

Le specie più frequenti nel settore enologico appartengono ai generi: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ed *Oenococcus*.

Il genere *Lactobacillus*, che comprende bacilli o cocco-bacilli (lunghezza 1-10 µm), disposti singoli o in catene (Fig. 1), capaci di crescere in un ampio range di pH (3-8, con un optimum tra 5,5 e 6,2) e temperature (2-53°C), possono avere metabolismo omofermentativo o eterofermentativo. Fra le specie più associate ai vini ci sono: *Lacticaseibacillus casei* e *Lactiplantibacillus plantarum* (eterofermentanti facoltativi), *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus hilgardii* e *Lentilactobacillus buchneri* (eterofermentanti obbligati), *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus helveticus* (omofermentanti).

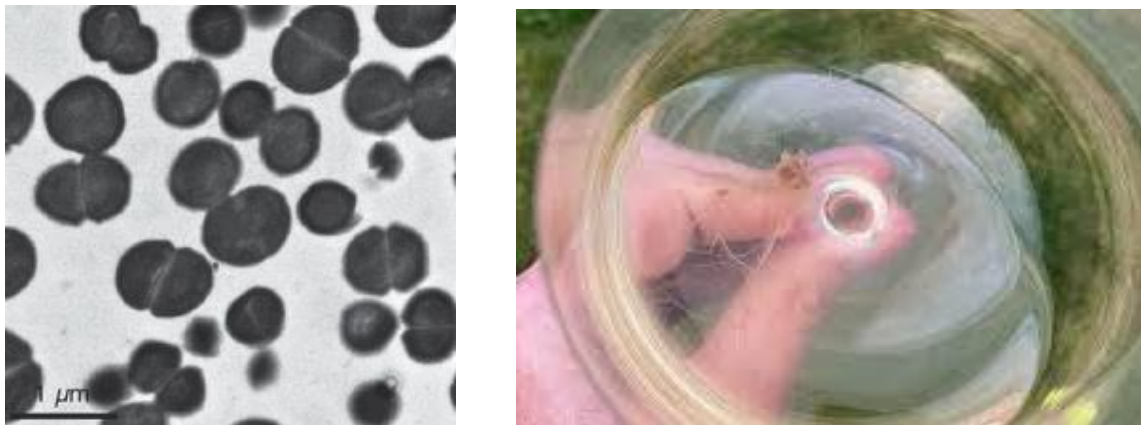


**Figura 1.** Immagine di *Lactiplantibacillus plantarum* al microscopio elettronico a scansione (SEM) (tratto da Devi e Anu-Appaiah, 2018).

Il genere *Leuconostoc* comprende cocchi sferici o leggermente allungati (diametro 0,5-0,7 µm) disposti in coppie o catene, anaerobi facoltativi, con metabolismo eterofermentativo, e capaci di tollerare etanolo e basse temperature. Solo la specie *L. mesenteroides* può trovarsi nei mosti ed essere presente in vinificazione.

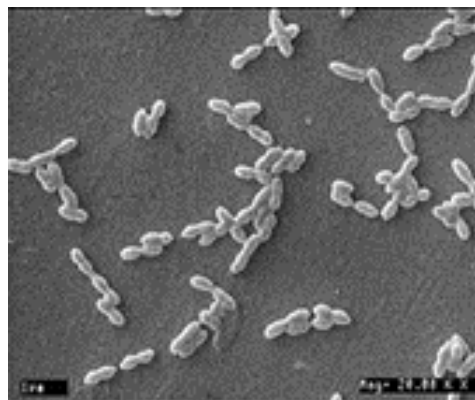


Il genere *Pediococcus* comprende cocci sferici (diametro 1-2  $\mu\text{m}$ ), disposti in tetradi (Fig. 2), anaerobi facoltativi, con metabolismo omofermentativo, e prediligono pH acidi (5, anche se in alcuni casi tollerano pH più elevati fino a 9) e temperature tra 25-35°C. Le specie d'interesse enologico sono: *P. damnosus*, *P. parvulus* e *P. pentosaceus*. Tuttavia, mentre gli altri LAB possono avere un impatto positivo sul vino, i pediococchi sono generalmente responsabili dell'effetto "filante" (Fig. 2) che si traduce in un prodotto viscoso per accumulo e produzione di esopolisaccaridi.



**Figura 2.** Immagine di *Pediococcus* spp. al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) (tratto da Garcia-Ruiz, 2009) ed effetto filante nel vino (tratto da wineanorak.com).

Infine, il genere *Oenococcus* comprende cocci sferici (diametro 0,5-0,6  $\mu\text{m}$ ) disposti in coppie o catenelle (Fig. 3), anaerobi facoltativi, acidofili (range di pH ottimale 4,2-4,8) e mesofili (range di temperatura ottimale 20-30°C), con metabolismo eterofermentativo. La specie più importante perché responsabile della fermentazione malolattica e meglio adattata alle condizioni dei vini è sicuramente *O. oeni*, classificato fino al 1995 come *Leuconostoc oenos*.



**Figura 3.** Immagine di *O. oeni* al microscopio elettronico a scansione (SEM) (tratto da Devi e Anu-Appaiah, 2018).

## 2.2 Principali vie metaboliche dei LAB

### 2.2.1 Metabolismo dei carboidrati

La principale fonte di energia per i LAB sono gli zuccheri. Nel mosto si trovano principalmente gli esosi, glucosio e fruttosio, e alcuni pentosi, fra cui arabinosio, xilosio e ribosio. Nel vino, dopo la fermentazione alcolica, si trovano bassi quantitativi di zuccheri (intorno a qualche centinaio di milligrammi per litro) che risultano insufficienti come fonte principale di sostentamento ma comunque utili ai LAB per formare la biomassa che poi svolgerà la FML. Le varie specie di LAB hanno metabolismi e sistemi enzimatici differenti per convertire gli zuccheri in energia, attraverso la fermentazione omolattica o eterolattica (Fig. 4).

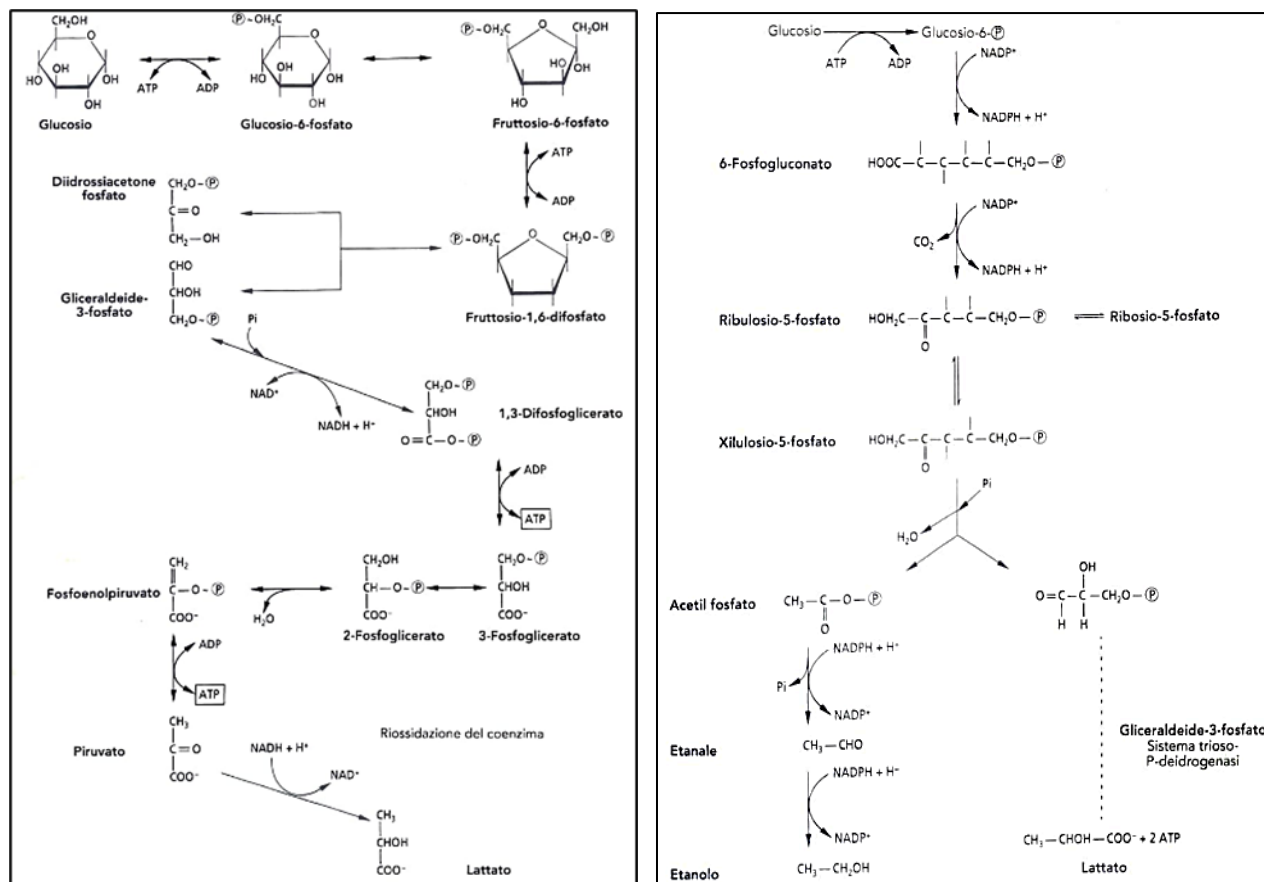


Figura 4. Metabolismo degli esosi da parte di batteri omofermentanti (a sinistra) ed eterofermentanti (a destra). (tratto da Trattato di enologia I, Ribéreau-Gayon et al., 2021)

Gli omofermentanti sono in grado di trasformare solo gli esosi, attraverso la via di Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP). Questa via prevede la formazione di piruvato che viene convertito, attraverso la lattato deidrogenasi, in acido lattico per ossidazione del NADH, prodotto nella glicolisi. I prodotti finali di questa via sono quindi esclusivamente una molecola di acido lattico e due di ATP, da una molecola di esoso di partenza.

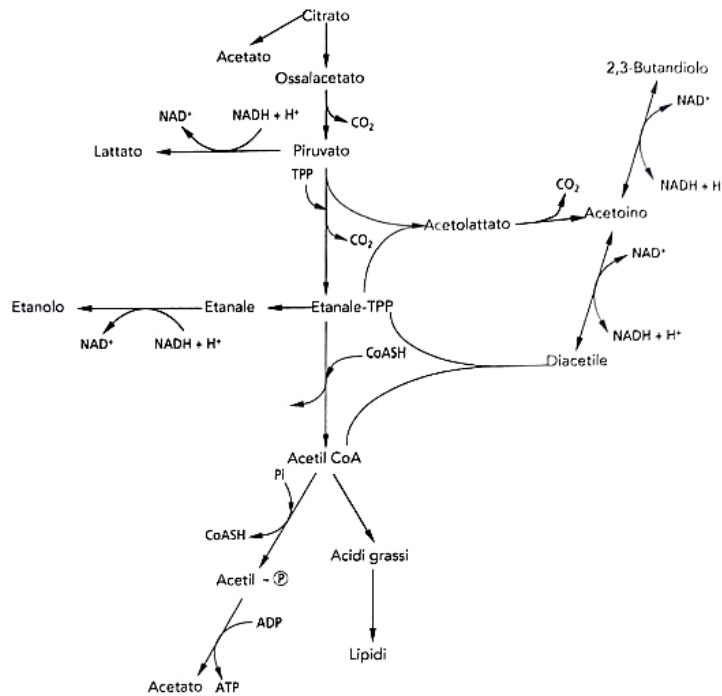
Gli eterofermentanti sono in grado di trasformare sia gli esosi che i pentosi, grazie all'enzima fosfochetolasi. I prodotti finali di questa via sono una molecola di acido lattico, una di CO<sub>2</sub>, una di ATP, un etanolo o, eventualmente, una molecola di acido acetico. Quest'ultimo caso comporterebbe un vantaggio del punto di vista energetico per la cellula data la contestuale produzione di un'ulteriore molecola di ATP. I batteri eterofermentanti si possono poi suddividere in obbligati e facoltativi. Gli eterofermentanti obbligati non possiedono l'aldolasi, di conseguenza possono trasformare esosi e pentosi solo attraverso la fermentazione eterolattica, mentre gli eterofermentanti facoltativi utilizzano la via di EMP per gli esosi e la via eterolattica per i pentosi.

I LAB possono produrre diversi isomeri dell'acido lattico (DL o D-, L+) in base ai loro enzimi. Per quanto riguarda *O. oeni*, la fermentazione degli zuccheri forma acido D-lattico, che permette di distinguerlo dall'acido L-lattico prodotto con la FML.

### **2.2.2 Metabolismo dell'acido citrico**

L'acido citrico è presente nel mosto e nel vino, in concentrazione di 0,5-1 g/l, prima della FML. Alcuni LAB, fra cui *O. oeni*, *Lpb. plantarum* e *L. casei*, possono degradare l'acido citrico con produzione di acido acetico, CO<sub>2</sub> e piruvato che a sua volta può essere convertito in altre molecole (Fig. 5). Il citrato non è quindi una fonte diretta di energia ma può fornire quantità supplementari di piruvato rispetto a quello necessario per riossidare il NADH. Il consumo del citrato può iniziare in contemporanea alla degradazione del malato, ma siccome si svolge più lentamente può terminare diverso tempo dopo la fine della FML. Il citrato, al pH del vino, penetra per diffusione nella cellula e viene scisso in acido acetico e acido ossalacetico dall'enzima citrato liasi. La produzione di questo enzima viene usata per discriminare le specie e i ceppi che degradano il citrato, da quelli che invece non lo metabolizzano. L'acido ossalacetico viene poi decarbossilato a piruvato, che può avere diverse destinazioni: sostanze acetoiniche, etanolo,

lattato, sintesi di acidi grassi (via acetil-CoA). I prodotti del metabolismo del citrato sono così molto diversificati e la loro regolazione è influenzata dalle condizioni del mezzo. L'unica costante è l'aumento dell'acidità volatile dovuta alla produzione di acido acetico. A basse concentrazioni di glucosio, basso pH e presenza di sostanze inibenti, la sintesi di sostanze acetoiniche è favorita, in quanto, per mancanza di coenzimi ridotti, il piruvato non può essere usato per produrre altre molecole e deve essere estruso dalla cellula per mantenere costante il pH intracellulare.



**Figura 5.** *Metabolismo dell'acido citrico (tratto da Trattato di enologia 1 di Ribéreau-Gayon et al., 2021).*

### 2.2.3 Metabolismo dei composti azotati

Il mosto d'uva contiene amminoacidi (1-4 g/l), i principali sono arginina (di norma il più abbondante), alanina, prolina, acido glutammico, glutammina e serina. La concentrazione di amminoacidi presenti nel mosto dipende da numerosi fattori, fra cui: la cultivar vinificata (il cui genotipo influenza quantità e natura degli amminoacidi), le pratiche colturali, le condizioni climatiche dell'annata, il livello di maturazione delle uve, le tecniche enologiche applicate (in particolare la macerazione) (Costantini et al., 2019). I LAB hanno scarse capacità di sintetizzare amminoacidi da fonti azotate inorganiche, di conseguenza necessitano di fonti di azoto presenti

in forma assimilabile nel mezzo per la loro crescita. In particolare, per svilupparsi hanno bisogno di arginina e altri amminoacidi a catena ramificata anche se in generale il fabbisogno di amminoacidi essenziali varia da ceppo a ceppo (Fugelsang e Edwards, 1997 citati da Lerm et al., 2010). Possono inoltre, metabolizzare amminoacidi solforati (metionina e cisteina) rilasciando composti a base di solfo che possono contribuire alla complessità del profilo aromatico del vino, ad esempio l'acido 3-(metilesulfonyl) propionico con sentore terroso e di frutti rossi.

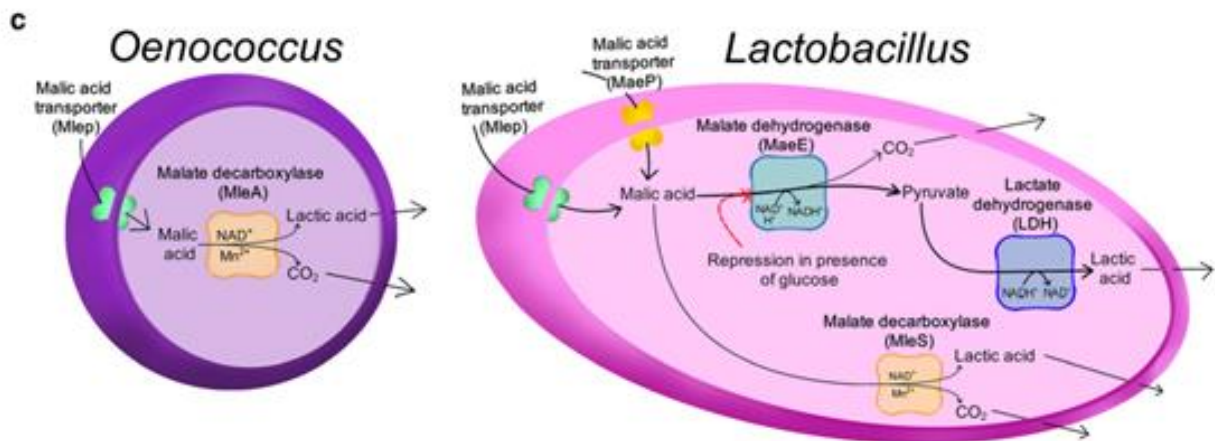
Gli amminoacidi, oltre a costituire una fonte di azoto prontamente assimilabile, possono anche essere metabolizzati a scopo energetico. Questi processi da un lato favoriscono la crescita dei LAB, in particolare in condizioni difficili di crescita, dall'altro comportano la sintesi di composti potenzialmente dannosi per la salubrità del prodotto, come amine biogene ed etilcarbammato (vedere paragrafi 2.3.6 e 2.3.7).

#### **2.2.4 Fermentazione malolattica (FML)**

L'acido malico si trova nei mosti e nei vini in concentrazione variabile da 0,5 a 10 g/l. I LAB sono in grado di trasformare direttamente l'acido L-malico in acido L-lattico e CO<sub>2</sub> attraverso l'azione dell'enzima malolattico che viene indotto dalla presenza del substrato e può funzionare solo all'interno della cellula in quanto lavora ad un pH minimo di 4,35 e ottimale di 5,9, nettamente superiore al pH del vino. L'attività dell'enzima malolattico è stata studiata nella maggior parte dei LAB d'interesse enologico, fra cui *O. oeni*, *Lpb. plantarum*, *L. casei* e *Leuconostoc mesenteroides*.

La FML può essere divisa in tre passaggi (Fig. 6): 1) l'acido L-malato viene trasportato nella cellula con un sistema uniporto per opera della malato-permeasi, codificato dal gene *mleP*; 2) l'acido malico viene decarbossilato ad acido L-lattico dall'enzima malolattico, codificato dal gene *mleA*, che necessita di NAD<sup>+</sup> e di cationi bivalenti (Mn<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>), come cofattori enzimatici; 3) infine, l'acido lattico viene espulso dalla cellula per diffusione passiva, insieme ad un protone H<sup>+</sup> (simporto). I lattobacilli possiedono anche una via alternativa in cui l'acido L-malico viene prima trasformato in acido piruvico che viene poi ridotto ad acido L-lattico dall'enzima lattato deidrogenasi. In generale, l'ingresso di una molecola carica negativamente (L-malato) e l'uscita di una molecola neutra (acido L-lattico), crea una differenza di potenziale elettrico fra l'esterno e l'interno della cellula. In aggiunta, l'efflusso di H<sup>+</sup> genera un gradiente protonico e di pH che

induce un'alcalinizzazione del citoplasma. Questi due processi generano sufficiente forza proton-motrice, che viene sfruttata dalle ATPasi di membrana per la produzione di ATP (Cox e Henick-Kling, 1989). La FML non è quindi un processo che produce direttamente energia, ma è vantaggioso per la cellula batterica che sfrutta la forza proton-motrice che si è creata per sintetizzare ATP o per il trasporto di metaboliti attraverso la membrana. La FML favorisce dunque la crescita dei batteri lattici nel vino, che, dopo fermentazione alcolica, risulta essere un mezzo povero di nutrienti e ricco di sostanze inibenti prodotte dai lieviti.



**Figura 6.** Fermentazione malolattica *Oenococcus oeni* e *Lactobacillus* spp. (tratto da Sumby et al., 2019).

### 2.3 Influenza complessiva del metabolismo dei LAB sul vino

Il metabolismo dei LAB comporta vari cambiamenti sulle caratteristiche del vino, in aggiunta a quelli attribuibili alla sola fermentazione malolattica. I substrati che possono essere trasformati sono numerosi e, oltre a quelli principali (acido malico e zuccheri), comprendono composti fenolici, precursori aromatici, aromi, composti azotati etc. Gli effetti di queste vie metaboliche secondarie potranno avere un impatto favorevole sulla qualità del vino, mentre altre potrebbero generare difetti organolettici o produrre composti dannosi per la salubrità del vino. L'influenza di queste trasformazioni secondarie, in base ai composti metabolizzati, può quindi agire profondamente sulle caratteristiche organolettiche, al pari delle trasformazioni principali.

### **2.3.1 Sintesi e idrolisi di esteri**

Gli esteri sono composti volatili odorosi associati ad aromi fruttati, di estrema rilevanza per l'aroma fermentativo del vino (Waterhouse et al., 2016). La maggior parte dei ceppi enologici di LAB possiede esterasi, enzimi in grado sia di sintetizzare che di idrolizzare gli esteri, ad esempio l'attività enzimatica dei ceppi di *O. oeni* sembra particolarmente efficiente verso gli esteri etilici e quelli a corta catena. Questa attività enzimatica varia in base al ceppo e al vino considerato e provoca un cambiamento quali-quantitativo di questi, contribuendo alla variazione del profilo sensoriale (Sumbly et al., 2013).

### **2.3.2 Attività glucosidasica**

I LAB, sia vari ceppi di *O. oeni* che altri appartenenti ad altri generi come *Lactobacillus*, possiedono enzimi in grado di liberare nel vino alcuni degli aromi presenti nelle uve, come terpeni e norisoprenoidi. Nelle uve e nei mosti questi si ritrovano sotto forma di precursori inodori legati agli zuccheri (principalmente glucosio) che, solo dopo la rottura di questo legame, diventano volatili (Viridis et al., 2021). L'attività glucosidasica è influenzata dal ceppo, dalla struttura del substrato, dalla fase di crescita dei batteri e dalle condizioni del mezzo, in particolare pH, temperatura, zuccheri ed etanolo (Lerm et al., 2010). Inoltre, secondo Bloem (2008) la reazione sembra rallentata in condizioni acide, consentendone il rilascio anche durante l'affinamento in bottiglia, fungendo così da riserva di aromi latenti. In aggiunta, nel caso in cui la FML sia svolta in botte, le glucosidasi di *O. oeni* sono in grado di dissolvere nel vino importanti composti odorosi del legno, come vanillina e whiskylattone (associati all'aroma di vaniglia) (Silvano et al., 2016).

### **2.3.3 Metabolismo dell'acetaldeide**

L'acetaldeide è un composto importante nel vino ed è quello che lega più stabilmente l'SO<sub>2</sub> presente. Inoltre, ha un impatto sensoriale, in quanto un suo eccesso è associato all'odore ossidato di mela tagliata, ed è anche in grado di stabilizzare il colore dei vini rossi. Molti LAB, indipendentemente dal tipo di metabolismo degli zuccheri, sono in grado di degradare l'acetaldeide sia libera che legata all'SO<sub>2</sub>. Questa capacità è fortemente influenzata dal ceppo, sia nei lattobacilli che nei pediococchi. I prodotti principali sono etanolo e acido acetico, il cui

impatto risulta però poco significativo, in quanto l'acetaldeide è presente in quantità modeste nei vini (20-100 mg/l). La degradazione della frazione di acetaldeide legata all'SO<sub>2</sub> porta al rilascio di SO<sub>2</sub> libera che può inibire la crescita dei LAB sensibili all'SO<sub>2</sub>. Tuttavia, questo comporterebbe anche la possibilità di diminuire l'SO<sub>2</sub> aggiunta per svolgere le sue funzioni antiossidanti e antimicrobiche. Di conseguenza, in base al tipo di vino, la degradazione potrà essere più favorevole, se si cerca di mascherarne il suo impatto sull'aroma e di ridurre l'uso di solfiti, o meno favorevole, se si vuole preservare la stabilità del colore dei vini rossi (Osborne et al., 2000).

### **2.3.4 Aumento dell'acidità volatile**

I LAB possono produrre acido acetico attraverso diverse vie metaboliche e quindi possono incrementare l'acidità volatile del vino. Durante il metabolismo eterofermentativo degli zuccheri, la produzione di acido acetico al posto dell'etanolo consente la produzione di energia supplementare. Ciò avviene se la cellula ha a disposizione delle vie alternative per la riduzione del NADH, ad esempio in condizioni di areazione e in presenza di zuccheri (fruttosio). Alternativamente, durante il metabolismo del citrato, nella prima fase, la scissione di questo provoca sempre la formazione di una molecola di acido acetico. In aggiunta a quelle appena citate, esistono diversi altri substrati da cui i LAB possono produrre acido acetico, come il glicerolo e l'acido tartarico. Di conseguenza, è estremamente importante monitorare il metabolismo dei LAB, le specie ed i ceppi presenti, le condizioni del mezzo, in modo da evitare quelle che possono favorire l'aumento di acidità volatile.

### **2.3.5 Produzione di sostanze acetoiniche**

I composti acetoinici quali diacetile, 2,3-butandiolo e acetoino, hanno un importante impatto sull'aroma del vino. In particolare, il diacetile è quello con la soglia di percezione minore che, in relazione al tipo di vino e agli altri composti presenti, può aggiungere complessità al bouquet con note di burro e noce (se a basse concentrazioni, circa 3-4 mg/l), oppure conferisce note lattiche troppo marcate (se oltre 5-7 mg/l) (Bartowsky et al., 2004). Si ritiene che, nei vini bianchi il contributo positivo sul bouquet si abbia a 2-3 mg/l di diacetile, mentre per i rossi a circa 5 mg/l. Le sostanze acetoiniche vengono prodotte anche dai lieviti durante la fermentazione alcolica, ma in concentrazioni troppo basse per avere un impatto sensoriale. Infatti, anomale concentrazioni



sono di solito associate al metabolismo del citrato da parte dei LAB, che può generare tenori di diacetile anche oltre 10 mg/l.

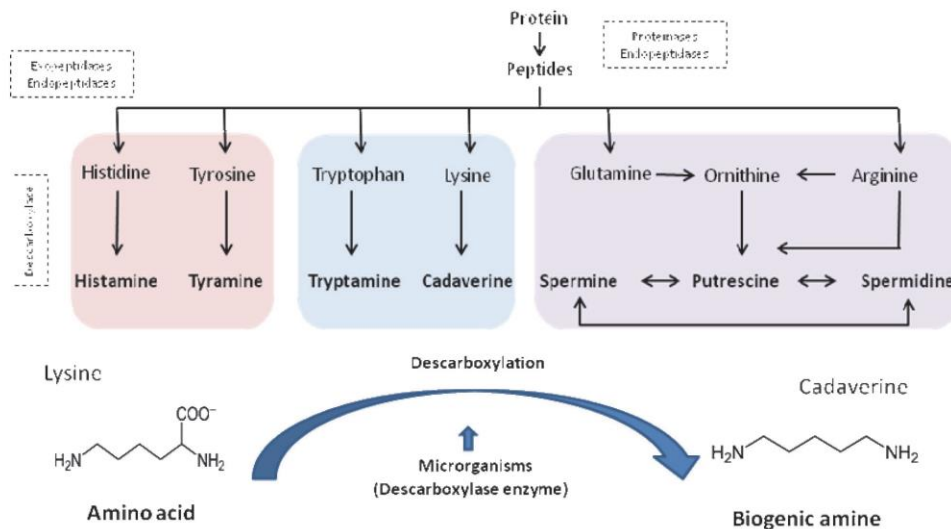
### **2.3.6 Formazione di etilcarbammato**

L'etilcarbammato (o uretano) è un composto potenzialmente dannoso per la salute umana. Nel vino può essere prodotto dai batteri lattici che metabolizzano l'arginina, con la via dell'arginina deaminasi. Questo processo è vantaggioso per la crescita batterica, in quanto si forma energia e ammoniaca, che permette di aumentare il pH del mezzo. Tuttavia, i composti intermedi di questa via (citrullina e carbamil fosfato) possono reagire con l'etanolo presente nel mezzo e formare uretano. I geni che codificano la produzione degli enzimi della via dell'arginina deaminasi, sono stati riscontrati in tutti i generi di LAB che possono trovarsi nel vino; anche se per quanto riguarda *O. oeni* la degradazione dovrebbe essere variabile in base al ceppo considerato (Araque et al., 2009). Nonostante l'etilcarbammato sia considerato un composto potenzialmente cancerogeno e genotossico (FAO, 2006), non sono stati imposti limiti legali nell'Unione Europea. Negli USA sono state emanate solo alcune raccomandazioni per quanto riguarda la concentrazione nei vini (non oltre 15 ppb).

### **2.3.7 Produzione di ammine biogene**

Le ammine biogene (AB) sono composti azotati che si ritrovano in molti alimenti, fra cui formaggi, insaccati e anche nei vini. Le principali AB presenti nel vino sono istamina, tiramina, cadaverina e putrescina. La loro ingestione non causa danni alla salute umana, in quanto nell'intestino sono presenti adeguati sistemi di detossificazione. Questi sistemi possono però essere inibiti da quantità molto elevate di AB o dalla presenza di sostanze inibenti, come l'etanolo (che sempre si ritrova nel vino) (Maintz e Novak, 2007). I LAB producono ammine biogene dalla decarbossilazione dei rispettivi amminoacidi precursori, ad esempio dall'istidina formano l'istamina. Da questa reazione riescono a ricavare energia e produrre ammoniaca per aumentare il pH del mezzo; infatti, tendono ad incrementare la produzione di AB quanto più le condizioni del mezzo sono difficili per la crescita. Le specie di LAB a cui è associata la produzione di AB sono principalmente: *O. oeni*, soprattutto per il contenuto di istamina (Guerrini et al., 2002); mentre per la tiramina sono i lattobacilli eterofermentanti, *L. brevis* e *L. hilgardii* (Moreno-Arribas et al., 2000). La capacità di decarbossilare gli amminoacidi è comunque molto variabile

e dipende sia dalla specie e dal ceppo che dalle condizioni ambientali (in primis il contenuto di amminoacidi precursori) (Costantini et al., 2019).



**Figura 7.** Formazione di ammine biogene e processo di decarbossilazione (tratto da de la Torre e Conte-Junior, 2013).

Nei vini rossi, in cui di solito viene svolta la FML, di norma si riscontrano quantitativi maggiori di AB (fino a 30 mg/l) rispetto ai bianchi (10 mg/l) che di norma non la svolgono. Ad oggi non sono stati fissati limiti legali sul il contenuto di amine biogene nei vini. Ciononostante, alcuni paesi in Europa hanno posto dei limiti massimi solo sul contenuto d'istamina che, in base al paese, vanno da 2 a 10 mg/l (Schumacher et al., 2012).

### 2.3.8 Degradazione del glicerolo

Il glicerolo è uno dei composti presenti in maggior concentrazione nel vino (in media 5-10 g/l) e svolge un'importante funzione organolettica, fornendo morbidezza al gusto. Alcuni LAB sono in grado di degradare il glicerolo provocando, oltre ad un calo di concentrazione di questo, anche la formazione di composti dal gusto amaro (Popescu-Mitroi et al., 2014). In particolare, alcuni ceppi di *O. oeni*, *L. hilgardii* e *L. buchneri* (che possono ritrovarsi nella microflora presente nel vino responsabili della FML spontanea) possono degradare il glicerolo attraverso due vie metaboliche. La prima, meno diffusa, ad opera di una glicerolo-deidratasi porta alla formazione del precursore dell'acroleina ( $\beta$ -idrossipropionaldeide), la cui combinazione con i tannini provoca la comparsa di sapore amaro. La seconda via forma, attraverso una glicerolo-chinasi, glicerolo-3-fosfato che entra nella via glicolitica formando piruvato. Questa molecola, in base alle condizioni del mezzo, può essere convertita in acido acetico, acido lattico o composti

acetoinici. La proporzione dei prodotti dipende principalmente dalla concentrazione di zuccheri, che devono sempre essere presenti per il loro co-metabolismo con il glicerolo (che non può fungere da unica fonte di energia) ed il livello di aerazione.

### **2.3.9 Fenoli volatili**

Fra i composti fenolici presenti nel vino vi sono gli acidi idrossicinnamici, come acido ferulico e p-cumarico. Questi possono essere metabolizzati dai microrganismi presenti nel vino e trasformati in fenoli volatili, come 4-etilguaiacolo e 4-etilfenolo, i quali provocano difetti nell'aroma del vino, come odori sgradevoli di "stalla". Questi difetti sono associati principalmente al lievito *Brettanomyces/Dekkera* (Chatonnet et al., 1992). Anche varie specie di LAB possono metabolizzare gli acidi idrossicinnamici e produrre fenoli volatili, attraverso un'attività cinnamil-esterasica (CE). Tuttavia, non è chiaro se i ceppi di *O. oeni* con attività CE possano produrre fenoli volatili in quantità sufficiente da avere un effettivo impatto sensoriale (Lerm et al., 2010; Viridis et al., 2021). Questa attività nei ceppi enologici è ancora in fase di studio e si ritiene che la quantità di fenoli volatili dipenda principalmente dalla presenza di *Brettanomyces/Dekkera*.

## **CAPITOLO 3 - Fattori chimico-fisici che influenzano lo sviluppo e il metabolismo dei LAB**

L'andamento della FML così come la produzione di certi metaboliti piuttosto che altri dipendono da una serie di fattori estrinseci che vanno considerati nel loro insieme. I principali sono: pH, anidride solforosa, etanolo e temperatura. La temperatura e l'SO<sub>2</sub> sono i fattori più controllabili, mentre pH ed etanolo sono scarsamente controllabili. Tutti gli altri elementi coinvolti hanno un impatto decisamente inferiore e sono valutati come secondari.

### **3.1 pH**

I LAB sono batteri acidofili e riescono a sviluppare a pH del vino, intorno a valori di 3,5. A pH più basso, circa 3, la crescita risulta rallentata; mentre a pH maggiori la crescita accelera. La capacità di tollerare pH bassi dipende dal pH intracellulare (pHi). La crescita viene sospesa quando questo raggiunge un valore limite. Il limite inferiore di pH tollerato per il pHi dipende dalla specie e, in particolare, dal ceppo. Il pH basso è quindi un elemento di selezione per le popolazioni batteriche nel vino. Ad esempio, *O. oeni* risulta particolarmente adattato, in quanto, rispetto alle altre specie di LAB, a pH 3,5 riesce a mantenere un pHi più alto. Di conseguenza, vini con pH relativamente alto (oltre 3,5-3,7) consentiranno la crescita più abbondante e di un maggior numero di specie batteriche, risultando più suscettibili ad eventuali alterazioni microbiche. La velocità della FML dipende sia dall'attività dell'enzima malolattico che dal numero di cellule, entrambi favoriti da pH più elevati. Per questo la FML risulterà più rapida all'aumentare del pH (a parità di tutti gli altri parametri). Inoltre, il pH influisce sulla natura dei substrati trasformati (Ribéreau-Gayon et al., 1975), infatti il pH minimo per la FML è inferiore a quello del metabolismo degli zuccheri. In questo intervallo i LAB degraderanno l'acido malico senza consumare gli zuccheri, evitando così di produrre acido acetico.

### **3.2 Anidride solforosa**

L'anidride solforosa (SO<sub>2</sub>) è un composto ad azione antimicrobica sempre presente nel vino, impiegato come additivo e prodotto dai lieviti. Penetrando nella cellula l'SO<sub>2</sub> ne danneggia molti componenti ed è inoltre in grado di inibire l'attività dell'enzima malolattico in *Oenococcus*. Le condizioni di crescita per i LAB diventano difficili intorno a valori di SO<sub>2</sub> libera oltre 10 mg/l e

SO<sub>2</sub> totale oltre 100 mg/l. La sensibilità al diossido di zolfo dipende dalla specie e dal ceppo, ad esempio *O. oeni*, se preadattato, riesce a sviluppare una tolleranza a concentrazioni di solfito sub-letali (15 mg/l) (Suzzi e Tofalo, 2021); mentre i ceppi “filanti” di *Pediococcus* tollerano facilmente dosi che risultano letali per altri generi. Non trascurabile è però l’influenza delle condizioni ambientali: in particolare al diminuire del pH, l’efficacia dell’S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aumenta. Pertanto, a pH più bassi sarà necessaria una quantità inferiore di SO<sub>2</sub> per inibire la crescita dei LAB e viceversa.

### **3.3 Etanolo**

L’etanolo è un composto dannoso per la crescita dei LAB e la sua sensibilità varia in base alla temperatura. Infatti, all’aumentare di questa aumenta la tossicità dell’etanolo per la specie e il ceppo considerato. Per quanto riguarda *O. oeni*, la crescita è stimolata da concentrazioni di etanolo di 5-6% vol, mentre viene inibita a 13-14% vol. I lattobacilli eterofermentanti sembrano più adattati all’etanolo e alcuni ceppi sono in grado di sviluppare fino a concentrazioni di 16-20% vol. I meccanismi di adattamento non sono ancora stati chiariti ma sembrano collegati a modificazioni strutturali a livello della membrana cellulare (Graça Silveira et al., 2004).

### **3.4 Temperatura**

I LAB sono mesofili, cioè, possono crescere da 15 a 45°C, con un optimum di temperatura che va da 20-37°C. In particolare, *O. oeni* ha una temperatura ideale di sviluppo di 27-30°C, che diminuisce in funzione della concentrazione di etanolo. Il range ottimale per lo svolgimento della FML è 20-25°C, consentendo un adeguato tasso di crescita e di attività metabolica. A temperature più alte viene inibita la moltiplicazione e aumenta il rischio di deviazioni organolettiche (aumento dell’acidità volatile). A temperature più basse le attività metaboliche sono rallentate, dunque potranno esserci difficoltà nell’avvio della FML o nel caso in cui sia già avviata, può essere svolta richiedendo tempi più lunghi, anche fino a diverse settimane o mesi.

### **3.5 Fattori secondari**

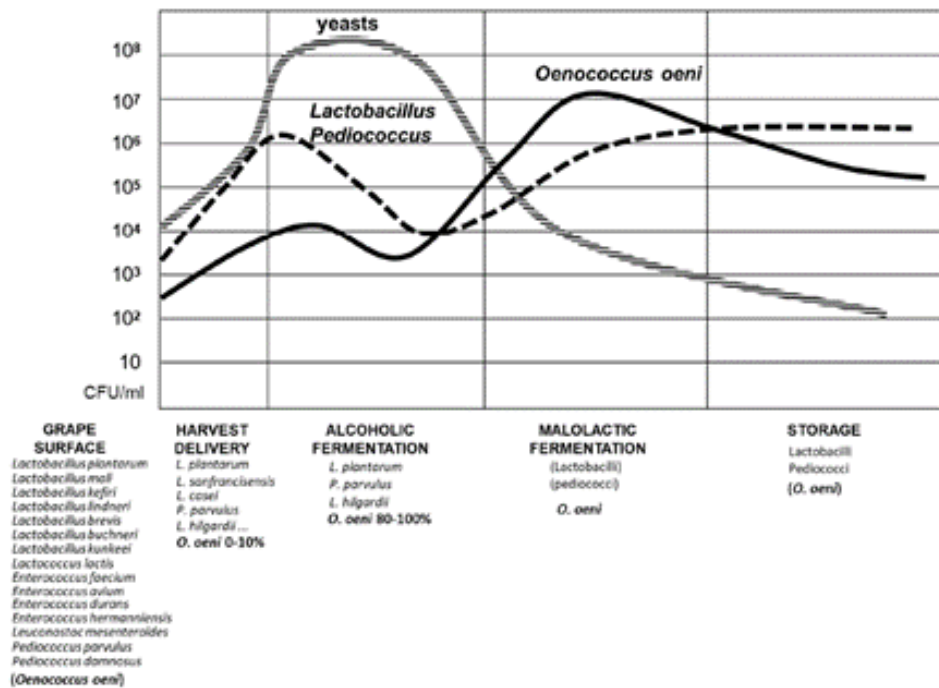
Gli altri fattori che possono influenzare la FML sono molteplici e dipendono in larga misura dalla composizione del vino, a questa si aggiungono le interazioni microbiche fra lieviti e batteri. Fra i composti presenti nel vino che possono influenzare la crescita dei LAB vi sono gli acidi

organici, in particolare le concentrazioni di L-malico e L-lattico. L'acido L-malico stimola la crescita batterica a pH bassi, quando il metabolismo degli zuccheri è rallentato. L'aumento di pH che deriva dalla FML facilita il metabolismo degli zuccheri, motivando l'effetto stimolante dell'L-malato sulla crescita. Tuttavia, la presenza nel vino di alte concentrazioni di L-malico provocherà un aumento di acido L-lattico. Quest'ultimo è in grado di sfavorire la crescita di *O. oeni* fino ad inibirla se raggiunge concentrazioni di 3 g/l (Bauer et al., 2004).

È noto, poi, che i LAB sono esigenti dal punto di vista nutrizionale, viste le loro scarse capacità biosintetiche. Diviene quindi fondamentale la presenza nel mezzo di alcuni substrati essenziali per la crescita, che variano da ceppo a ceppo. Fra questi vi sono alcuni amminoacidi (ad esempio arginina, acido glutammico, cisteina e tirosina), vari cofattori minerali (in particolare  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) e molte vitamine del gruppo B, come acido pantotenico, acido nicotinico, tiamina e riboflavina. Di conseguenza, vini poveri di nutrienti, specie se inoculati con ceppi di lieviti con elevate esigenze nutrizionali, potrebbero gravare sulla facilità di sviluppo dei LAB. Tuttavia, sia gli elementi minerali che le vitamine essenziali sono solitamente presenti in quantità sufficiente nei vini. Pertanto, è più probabile che le difficoltà di crescita siano dovute alla presenza di inibitori, piuttosto che a carenze nutrizionali. In aggiunta, anche i composti fenolici, in base alla loro natura e concentrazione, possono favorire o inibire la crescita dei LAB (García-Ruiz., 2009). Le procianidine dei semi e gli ellagitannini sembrano avere effetto inibente, mentre l'acido gallico e gli antociani stimolano la crescita. Infatti, trovandosi legati al glucosio nel vino, gli antociani possono essere liberati dai LAB attraverso le  $\beta$ -glucosidasi. Una volta liberati gli antociani, i LAB potranno metabolizzare il glucosio ad essi legato.

## CAPITOLO 4 - Evoluzione dei LAB durante la vinificazione e interazioni con altri microrganismi

Il mosto rappresenta un sistema microbiologicamente complesso, costituito principalmente da lieviti e batteri. I LAB si trovano già nel mosto appena prodotto perché presenti nel campo, sulle uve oppure derivanti dall'ambiente di lavorazione (serbatoi di fermentazione, tubi e valvole). Nel vigneto, la diversità delle specie di batteri lattici associati alle superfici delle uve è piuttosto limitata date le loro elevate esigenze nutrizionali e il fatto che il loro numero è inferiore rispetto a quello dei lieviti. Tra le specie più predominanti sulle uve si ricordano *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* mentre il genere *Oenococcus* è meno rappresentato. La popolazione iniziale di LAB sulle uve varia da  $10^3$  a  $10^4$  UFC/ml.

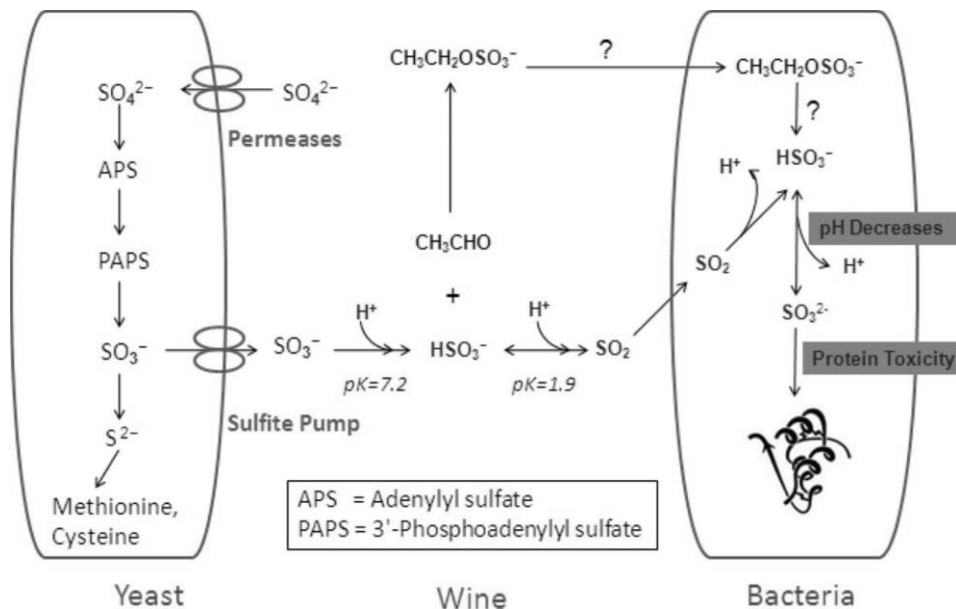


**Figura 8.** Cinetica di crescita dei microrganismi ad interesse enologico dalla vigna al vino (tratto da: Krieger-Weber et al., 2020).

Tra lieviti e batteri lattici si possono instaurare diversi tipi di interazioni: lievito-lievito, batteri-lievito e batteri-batteri. Le interazioni che si instaurano fra lieviti e batteri sono di fondamentale importanza perché influenzano in modo diretto lo svolgimento della fermentazione alcolica e malolattica, da cui dipende la qualità del vino. Possono essere di tre tipi: antagonismo/amensalismo, competizione per i substrati e commensalismo. Come si può vedere

dalla figura 8, i lieviti prendono sempre il sopravvento sui batteri, poiché sono meglio adattati alle condizioni del mezzo, mentre le specie *Lactobacillus* e *Pediococcus* tendono a scomparire progressivamente.

Questa riduzione dei LAB è dovuta a principalmente a processi di amensalismo/antagonismo. I lieviti, infatti, producono etanolo, SO<sub>2</sub> e acidi grassi a media catena. Il primo è il metabolita principale della FA mentre il secondo viene prodotto durante la via di riduzione del solfato per produrre aminoacidi (Duan et al., 2004). L'efflusso di solfito tramite la pompa SSU1 è considerato un percorso di detossificazione per le cellule di lievito (Park e Bakalinsky, 2000). Il solfito rilasciato si trasforma in bisolfito e SO<sub>2</sub> molecolare nell'ambiente acido del vino. La SO<sub>2</sub> ha un effetto dannoso poiché, nella sua forma libera, entra nella cellula e viene convertita in bisolfito e solfito liberando così protoni e acidificando il citoplasma. Inoltre, la SO<sub>2</sub> può reagire con vari componenti cellulari, come ATPasi e cofattore NAD<sup>+</sup> inibendo la crescita dei LAB (Fig. 9). Non solo, anche la sua forma combinata (principalmente con aldeide acetica) sfavorisce la FML, in quanto i LAB possono metabolizzare l'acetaldeide liberando la forma libera.



**Figura 9.** Effetto di SO<sub>2</sub> prodotta dai lieviti sui LAB (tratto da Liu et al., 2017).



Per quanto riguarda gli acidi grassi a media catena liberati dai lieviti, essi sono principalmente: acido esanoico, ottanoico, decanoico e dodecanoico. La loro azione tossica si esplica a livello della membrana cellulare dei batteri, dove causano squilibri nel mantenimento del pH intracellulare e del gradiente protonico, inibendo l'attività malolattica. L'effetto inibitorio dipende dal tipo di acido, dalla sua concentrazione e può agire in sinergia con etanolo o basso pH. L'acido decanoico e dodecanoico sono i più tossici, infatti, rispettivamente oltre 12,5 e 2,5 mg/l sono in grado di inibire la FML (Capucho e San Romfio, 1994). Inoltre, la presenza simultanea di più acidi provoca un'inibizione maggiore rispetto alla presenza dei singoli acidi.

Allo stesso tempo, oltre ai processi di amensalismo, la competizione per il substrato risulta un ulteriore elemento che sfavorisce lo sviluppo dei LAB. Infatti, all'inizio della fermentazione alcolica, *S. cerevisiae* consuma rapidamente alcuni metaboliti presenti nel mosto come steroli, amminoacidi e vitamine, nonché inizia a depauperare il mosto di zuccheri. Pertanto, durante la FA, gli amminoacidi e vitamine essenziali per i batteri sono esauriti dai lieviti, al punto da ritardarne la crescita fino alla fase di morte delle cellule di lievito e alla loro lisi (Lerm et al., 2010). Dopo una fase transitoria, da quando la popolazione di lieviti è in fase stazionaria (fase in cui le cellule che si moltiplicano e quelle che muoiono si eguagliano) a quando è in fase di declino, i batteri riprendono la crescita attraverso un processo di commensalismo. Infatti, alla fine della FA gli effetti negativi dell'antagonismo dei lieviti verso i batteri sono compensati da altrettanti effetti positivi: le cellule di lievito, quando vanno incontro ad autolisi, liberano sostanze che stimolano lo sviluppo dei LAB. L'autolisi delle cellule di lievito gioca un ruolo fondamentale nella stimolazione dello sviluppo dei LAB, poiché comporta il rilascio di sostanze che ne stimolano la crescita. I principali composti rilasciati sono sostanze azotate (amminoacidi, peptidi, proteine) e componenti della parete cellulare quali polisaccaridi, come le mannoproteine. Le mannoproteine svolgono un duplice ruolo di stimolazione della crescita batterica. Operano infatti un'azione detossificante del mezzo, poiché sono in grado di adsorbire gli acidi grassi a media catena tossici prodotti dai lieviti. In più, possono fungere da fonte di nutrienti in quanto possono essere idrolizzate dai LAB, stimolando il rilascio di enzimi idrolitici da parte dei batteri che accelerano la demolizione della parete dei lieviti (Alexandre et al., 2004). Tuttavia, se non controllato e troppo repentino, questo fenomeno può intensificarsi e arrivare a provocare

rallentamenti o arresti della fermentazione alcolica. Per la FML, invece, lo sviluppo di LAB è necessario ma a fine FA. In particolare, a bassi pH (intorno a 3,5) e basse temperature, *O. oeni* tende a svilupparsi più velocemente raggiungendo livelli superiori a  $10^6$  cellule/ml e diventando talvolta l'unica specie batterica rilevabile. Contrariamente, a pH e temperature più elevate sviluppano meglio generi come *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Tra i lattobacilli, esistono delle specie desiderate capaci di portare avanti la FML in condizioni spontanee come ad esempio *Lpb. plantarum*. Infatti, come *O. oeni*, *Lpb. plantarum* può tollerare alti livelli di etanolo (fino al 14% v/v) e di SO<sub>2</sub>. Capire quindi le interazioni microbiche alla base della vinificazione è fondamentale per l'ottenimento di un prodotto di qualità (Liu et al., 2017).

## **CAPITOLO 5 - Uso di starter per la fermentazione malolattica**

Come riportato nei capitoli precedenti, la FML può essere condotta da batteri lattici indigeni che derivano dalle uve e dalle attrezzature di cantina, avvenendo così spontaneamente quando le condizioni esterne lo permettono. La specie più idonea allo svolgimento della FML è *O. oeni*, poiché è in grado di adattarsi alle condizioni sfavorevoli del vino (alte concentrazioni di etanolo, presenza di SO<sub>2</sub>, pH basso) e di portare a termine la fermentazione limitando le deviazioni organolettiche. Anche quando la FML è spontanea, i diversi ceppi di *O. oeni* presenti prendono il sopravvento sulle altre specie di LAB e si selezionano fra loro quelli più resistenti alle condizioni ambientali. Tuttavia, data l'ampia variabilità intraspecifica, non tutti i ceppi di *O. oeni* sono in grado di svolgere la fermentazione in modo efficiente, rapido e senza provocare alterazioni. Per questo si è diffusa la pratica di inoculare ceppi selezionati (colture co-starter) di *O. oeni* o di altre specie di LAB, idonei all'ottimizzazione del processo fermentativo. Questa pratica consente numerosi vantaggi, fra cui: 1) accorciare i tempi di avvio della fermentazione che, se spontanea, può richiedere settimane o mesi; 2) limitare l'aumento di acidità volatile, controllare e prevenire eventuali deviazioni organolettiche e di sicurezza; 3) standardizzare il processo e definire i caratteri qualitativi del vino, poiché la FML spontanea può originare aromi e gusti anomali, causati dal metabolismo secondario dei LAB. Le colture co-starter vengono commercializzate in forma congelata, liofilizzata o liquida e possono essere inoculate dopo la fermentazione alcolica o co-inoculate insieme ai lieviti.

### **5.1 Caratteri di selezione degli starter malolattici**

La selezione dei ceppi di *O. oeni* e altri batteri malolattici è fondamentale per identificare quelli più idonei al processo di vinificazione. I ceppi d'interesse vengono isolati dall'uva o dall'ambiente vinario. Gli starter, in generale, devono sopravvivere alle condizioni del processo e svolgere le attività richieste senza produrre sostanze indesiderate. Sulla base di questo vengono valutati secondo diversi criteri. Secondo Krieger-Weber (2009) i caratteri di selezione comprendono determinate proprietà tecnologiche e qualitative distinte in desiderate e indesiderate. Per quanto riguarda le proprietà tecnologiche desiderate, fra queste vi sono: resistenza a bassi pH, elevata tolleranza all'etanolo e all'SO<sub>2</sub>, ridotta fase lag di crescita, veloce degradazione dell'acido malico, resistenza agli stress durante la produzione, resistenza a

congelamento e liofilizzazione, resistenza ai fagi, buone performance a basse temperature; mentre fra quelle indesiderate vi sono: elevata velocità di degradazione dell'acido malico (in vini rossi e stabilità del colore), formazione eccessiva di esopolisaccaridi e sensibilità ai fagi. Per quanto riguarda le proprietà qualitative desiderate, fra queste si trovano: bassa affinità per zuccheri esosi e pentosi, attività esterasica, attività glucosidasica, arrotondamento del gusto e riduzione dell'astringenza, produzione di aromi positivi di frutta e riduzione di note vegetali. Quelle indesiderate, invece, comprendono: produzione di ammine biogene ed etilcarbammato, produzione di acidità volatile e veloce degradazione dell'acido citrico, elevata produzione di diacetile, produzione di fenoli volatili, degradazione del glicerolo, produzione/degradazione di acetaldeide, produzione di odori sgradevoli (composti solforati).

## **5.2 Modalità d'inoculo di batteri lattici**

Le diverse modalità d'inoculo dei batteri lattici possono essere impiegate per superare condizioni limitanti per la FML e per influenzare lo stile e la qualità del vino. Le principali modalità di svolgimento della FML sono l'inoculo sequenziale e il co-inoculo (Du Toit et al., 2017). La pratica del co-inoculo si è diffusa solo in tempi recenti per superare alcune problematiche dell'inoculo sequenziale, legate alle condizioni sfavorevoli del vino al termine della fermentazione alcolica che possono rallentare o inibire lo sviluppo dei LAB. I tre possibili momenti per indurre la FML sono: l'inoculo simultaneo di lieviti e batteri (co-inoculo), l'inoculo durante la fermentazione alcolica (co-inoculo tardivo) e l'inoculo al termine della fermentazione alcolica (inoculo sequenziale) (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2017; Lombardi et al., 2020). Ogni modalità ha sia vantaggi che rischi correlati e la scelta della tempistica più idonea dipende quindi da diversi fattori, fra cui: i ceppi di lieviti e di batteri impiegati e la loro compatibilità, le caratteristiche del mosto di partenza, lo stile di vino ricercato, la compatibilità dei tempi necessari per la FML con il processo produttivo delle cantine.

### **5.2.1 Co-inoculo**

La pratica del co-inoculo consiste nell'inoculo nel mosto di lieviti e batteri a circa 24-48 ore di distanza l'uno dall'altro o, comunque, l'inoculo dei batteri subito dopo l'inizio della FA. Questo approccio viene suggerito principalmente per promuovere simultaneamente entrambe le fermentazioni, ridurre le tempistiche e affrontare possibili arresti o ritardi nell'avvio della FML,

dovuti alle condizioni difficili a fine FA. Infatti, i batteri sviluppano meglio in un mosto piuttosto che in un vino. Uno dei principali benefici del co-inoculo è la riduzione dei tempi per la FML, in quanto i batteri hanno modo di adattarsi progressivamente alle condizioni del mezzo durante la FA, mantenendo elevati livelli di vitalità. In questo caso la FML può avvenire e concludersi prima della fine della FA. Il vino può così essere stabilizzato più velocemente, con solfitazioni al termine di entrambe le fermentazioni, riducendo i rischi di alterazione microbica. Dal punto di vista della qualità e del profilo aromatico il co-inoculo cambia lo stile del vino poiché dal mosto al vino variano i precursori aromatici e gli enzimi presenti. In particolare, i vini con co-inoculo risultano più fruttati, con minori note lattiche e si riscontrano tenori maggiori di esteri etilici e acetati. Il rischio maggiore è legato ad eventuali rallentamenti o arresti fermentativi, provocati da un elevato sviluppo dei LAB (antagonismo verso i lieviti). Ciò può comportare un importante aumento dell'acidità volatile, dovuto al consumo degli zuccheri del mosto da parte di batteri eterofermentanti, come *O. oeni*. Questo rischio è stato però eliminato attraverso la selezione di ceppi specifici, di adeguati protocolli di fermentazione e attraverso monitoraggi analitici puntuali (Guzzon et al., 2014). Studi condotti da Knoll et al. (2012), Cañas et al. (2015) e Guzzon et al. (2014), rispettivamente su Riesling, Cabernet Franc e Chardonnay, mostrano che, se la fermentazione alcolica è gestita e controllata in modo ottimale non si riscontrano differenze significative nella concentrazione di acido acetico fra co-inoculo e inoculo sequenziale. L'altro rischio è che il ceppo di lievito impiegato per la FA eserciti una forte azione antagonista sulla popolazione di LAB, inattivandola o riducendola notevolmente, con la possibilità di inibire la FML. Un'ulteriore modalità per la FML è il co-inoculo tardivo dei LAB durante la fermentazione alcolica. Questa pratica non è comune poiché le cellule di lievito esercitano il maggiore antagonismo in fase stazionaria (consumo di nutrienti, produzione di etanolo e di metaboliti tossici, calo del pH), provocando drastiche diminuzioni della popolazione di LAB.

La pratica del co-inoculo è, quindi, un'opzione valida per abbreviare i tempi, favorire la FML in condizioni difficili esaltando la qualità del vino finito. Per essere applicata, però, occorre porre una particolare attenzione alla valutazione preliminare della compatibilità dei ceppi di lieviti e batteri impiegati. La complessità delle interazioni non ha, tuttavia, ancora permesso di selezionare coppie di lieviti-batteri adatte a specifiche regioni o vitigni (Guilloux-Benatier et al., 2012).

### **5.2.2 Inoculo sequenziale**

L'inoculo sequenziale consiste nell'inoculare lo starter malolattico nel vino dopo la fine della fermentazione alcolica. In questa fase le cellule di lievito, liberano composti che stimolano la crescita dei LAB. L'arricchimento del mezzo in molecole stimolanti dipende dalla capacità autolitica dei lieviti, la quale varia in funzione del ceppo impiegato (Guilloux-Benatier et al., 2002). Il principale vantaggio di questa modalità d'inoculo è la mancanza di interazioni avverse fra lieviti e batteri. Questo diminuisce il rischio di arresti fermentativi durante la FA e del conseguente rischio di aumento dell'acidità volatile dovuto al consumo di zuccheri da parte di ceppi di LAB eterofermentanti. Inoltre, permette di ridurre l'inibizione dei LAB da parte dei lieviti durante la FA e, al tempo stesso, di stimolarne la crescita con l'autolisi delle cellule di lievito in fase di morte. Le principali criticità, invece, risiedono nel fatto che nel vino dopo la FA i batteri possano trovare condizioni sfavorevoli come: pH del vino relativamente bassi, basse temperature e altri fattori limitanti legati al metabolismo dei lieviti (elevati tenori di etanolo, scarsità di nutrienti). Queste condizioni possono determinare un allungamento dei tempi per l'avvio e lo svolgimento della FML fino a numerose settimane o mesi (tempi non sempre compatibili con i processi produttivi). Inoltre, i vini si ritrovano maggiormente esposti a rischi di alterazioni microbiologiche perché, per favorire lo sviluppo dei LAB, non si possono effettuare solfitazioni nell'attesa dell'avvio della FML (Guzzon et al., 2014).

## CAPITOLO 6 – Scopo della tesi

La fermentazione malolattica è un processo fermentativo di essenziale importanza nel settore enologico, secondo solo alla fermentazione alcolica. La FML permette di arrotondare i vini smorzandone l'acidità e aumentandone la complessità aromatica, oltre a stabilizzarli dal punto di vista microbiologico. La FML avviene ad opera di batteri lattici (LAB), di cui la specie più nota e studiata per questo processo è *Oenococcus oeni* poiché si adatta meglio alle condizioni del vino e limita le modificazioni organolettiche. Data l'ampia variabilità intraspecifica dei batteri lattici indigeni presenti nei mosti fermentati, per ottimizzare il processo si è sempre più diffusa la pratica di inoculare ceppi selezionati di *O. oeni*. La principale modalità d'inoculo è quello sequenziale dei batteri lattici alla fine della fermentazione alcolica. Questa pratica consente di favorire lo sviluppo batterico, sfruttando i nutrienti ceduti con la lisi delle cellule di lievito, nonché permette di evitare eventuali interazioni microbiche indesiderate, che possono verificarsi quando invece i LAB sono inoculati all'inizio della fermentazione alcolica (FA). Tuttavia, le condizioni avverse che i batteri trovano nel vino al termine della FA (l'alta concentrazione di etanolo, la scarsità di nutrienti e la presenza di anidride solforosa) possono provocare gravi rallentamenti nell'avvio e nello svolgimento della fermentazione malolattica.

In questo contesto è fondamentale creare le condizioni per rendere i batteri lattici il più efficienti possibile per un rapido e regolare svolgimento della FML. Una possibilità potrebbe essere quella del preadattamento della coltura co-starter batterica prima dell'inoculo. Questa pratica consiste nel coltivare il ceppo di LAB in condizioni sub-ottimali per lo sviluppo, acidificando il mezzo di crescita per renderlo più simile alle caratteristiche del vino. L'obiettivo principale è quello di portare le cellule batteriche in uno stato fisiologico più favorevole alla sopravvivenza una volta inoculate. In questa tesi è stato valutato, in un sistema modello (mosto sintetico fermentato), l'impatto di un preadattamento a diversi pH acidi (6,5 - 4,5 - 4 e 3,5) sulla capacità di *O. oeni* di performare al meglio nello svolgimento della FML. Le condizioni analizzate con preadattamento a diversi pH sono state valutate con analisi microbiologiche e chimiche.

## CAPITOLO 7 – Materiali e metodi

### 7.1 Microrganismi utilizzati e condizioni di crescita

Per questa tesi è stato utilizzato il ceppo di lievito commerciale *Saccharomyces cerevisiae* Institut Oenologique de Champagne (IOC) R9008 (Perdomini IOC, S. Martino Buon Albergo (VR), Italia) per lo svolgimento della fermentazione alcolica ed il ceppo commerciale di *Oenococcus oeni* LALVIN 31 per lo svolgimento della fermentazione malolattica. *S. cerevisiae* (IOC R9008) è stato coltivato su brodo di coltura costituito da Yeast Extract-Peptide-Dextrose Broth (YPD) a temperatura ambiente (circa 24°C) in condizione statica. *O. oeni* è stato coltivato in brodo di coltura costituito da De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) a 30°C in anaerobiosi. Per il preadattamento di *O. oeni* sono stati preparati terreni di MRS acidificati con HCl 5M e portati a cinque diversi valori di pH: 6,2; 5,5; 4,5; 4; e 3,5. *O. oeni* è stato fatto crescere per circa sette giorni, con rinfreschi ogni due giorni, ai diversi pH prima del suo utilizzo.

### 7.2 Preparazione del mosto sintetico

Allo scopo di limitare tutte le possibili variabili e interferenze presenti in un mosto d'uva, si è optato per un sistema modello costituito da un mosto sintetico. Per la preparazione del mosto sintetico (due litri) sono state seguite le indicazioni dell'Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV), che riporta la seguente lista di reagenti riferita ad un litro di mosto sintetico.

Glucosio	115 g/l	Acido folico	0.04 mg
Fruttosio	115 g/l	Acido aspartico	89 mg
Tartato di potassio	5 g/l	Acido glutammico	126 mg
Acido citrico	0.20 g/l	Alanina	26 mg
Acido L-malico	3 g/l	Arginina	188 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.14 g/l	Asparagina	39 mg
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1.23g/l	Fenilalanina	39 mg
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.44 g/l	Glicina	14 mg



MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	198.2 µg	Glutammina	51 mg
ZnCl <sub>2</sub>	135.5 µg	Isoleucina	51 mg
CuCl <sub>2</sub>	13.6 µg	Istidina	39 mg
FeCl <sub>2</sub>	32 µg	Leucina	76 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.7 µg	Lisina	63 mg
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	29.1 µg	Metionina	39 mg
NaMoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	24.2 µg	Prolina	126 mg
KIO <sub>3</sub>	10.8 µg	Serina	101 mg
Mio-inositolo	20 mg	Tirosina	6 mg
Piridossina cloridrato	0.40 mg	Treonina	89 mg
Acido nicotinico	0.40 mg	Triptofano	26 mg
Calcio pantotenato	0.20 mg	Valina	51 mg
Tiamina cloridrato	0.10 mg	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mg
Acido aminobenzoico	0.04 mg	Ergosterolo	10 mg
Riboflavina	0.04 mg	Tween 80	0.5 mg
Biotina	0.03 mg	pH	3.2-3.5

In una beuta da due litri sono state aggiunte le componenti in forma solida, tranne glucosio e fruttosio e i composti presenti in concentrazione dell'ordine del microgrammo (µg). Per questi ultimi sono state preparate alcune soluzioni stock con acqua distillata concentrate di mille volte. Successivamente sono stati aggiunti i composti in forma liquida e 2 ml di ogni soluzione concentrata mille volte (10 ml in totale) e 990 ml di acqua distillata. Dopodiché il mosto è stato messo con agitatore magnetico su piastra riscaldante a circa 50°C per miscelare e sciogliere tutti i componenti. Sono poi stati aggiunti glucosio e fruttosio (gradualmente per favorirne la dissoluzione) e 800 ml di acqua distillata. Il mosto è rimasto sulla piastra riscaldante finché tutti gli elementi non hanno formato una soluzione omogenea. Una volta tolto dalla piastra riscaldante, è stato necessario aggiungere aliquote di 50-100 µl di NaOH 5 M (4,7 ml in totale) in modo che raggiungesse un pH di 3,5. Si è poi portato a volume, 2 litri in totale, con acqua

distillata. Infine, il mosto è stato filtrato con pompa a vuoto utilizzando un filtro con porosità di  $0,22\ \mu\text{m}$  per renderlo sterile.

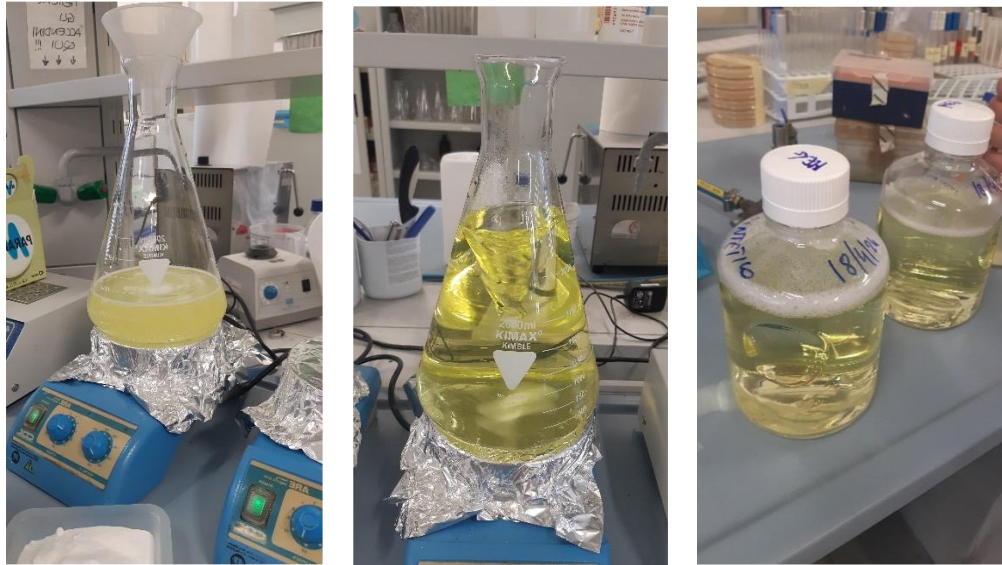


Figura 10. Preparazione del mosto sintetico

### 7.3 Fermentazione alcolica e inoculo di *Saccharomyces cerevisiae*

Per lo svolgimento della fermentazione alcolica, il mosto sintetico è stato inoculato con *S. cerevisiae* IOC R9008. L'inoculo è stato preparato partendo da una coltura fatta crescere in YPD per 24 ore a temperatura ambiente in agitazione. La biomassa è stata prima centrifugata, a 6000 giri (con rotore JA10) per 10 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ , e poi lavata con soluzione fisiologica ( $\text{NaCl}$  9 g/l). Infine, dopo ulteriore centrifugazione, la biomassa è stata risospesa in 100 ml di mosto sintetico e trasferita nella beuta con il restante mosto. In questo modo il carico cellulare di *S. cerevisiae* ad inizio fermentazione doveva aggirarsi intorno ai 7 Log UFC/ml.

Allo scopo di monitorare l'andamento della fermentazione alcolica, sulla superficie del mosto inoculato è stato messo uno strato di paraffina (di spessore pari a 1-2 cm). La paraffina essendo permeabile solo alla  $\text{CO}_2$  permette di monitorare il calo in peso dovuto all'allontanamento della  $\text{CO}_2$  prodotta dai lieviti durante la fermentazione. Il contenitore con il mosto inoculato è stato pesato ogni giorno, finché il peso non si è stabilizzato, segno questo di una fine fermentazione.

## 7.4 Fermentazione malolattica e inoculo di *Oenococcus oeni*

Prima di procedere con la FML, si è valutata la capacità di crescita di *O. oeni* nei vari terreni MRS ai diversi pH. A seguito di incubazione in anaerobiosi per 24 ore, i campioni sono poi stati diluiti in soluzione salina e si è proceduto ad effettuare diluizioni seriali decimali prima del piastramento in MRS. Questo step ha permesso di definire il carico cellulare per poi standardizzare gli inoculi da utilizzare nella FML.

Quando il calo in peso del mosto in fermentazione alcolica si è stabilizzato, con minime variazioni giornaliere, si è deciso di procedere con la FML. Il mosto fermentato è stato travasato e suddiviso in 4 contenitori in vetro (uno per ogni condizione sperimentale). In ogni contenitore sono stati messi 300 ml di mosto fermentato.

Le diverse condizioni per la FML, in base al pH di preadattamento di *O. oeni*, sono state:

TESI 1: pH 6,5 con un carico di  $10^8$  cellule/ml

TESI 2: pH 4,5 con un carico di  $10^8$  cellule/ml

TESI 3: pH 4 con un carico di  $10^8$  cellule/ml

TESI 4: pH 3,5 con un carico di  $10^8$  cellule/ml

Dopo preadattamento in MRS ai diversi pH, i campioni di *O. oeni* sono stati centrifugati a 6000 giri (con rotore JA10) per 10 minuti a 4°C, per eliminare il surnatante. Successivamente, le biomasse sono state lavate in isovolume con soluzione salina (NaCl 9 g/l) e ricentrifugate. Per le tesi 1, 2 e 3, il pellet iniziale derivante da 30 ml è stato risospeso in circa 30 ml di mosto fermentato (prelevato da ogni rispettivo contenitore per ogni condizione) e inoculato nel rispettivo contenitore (volume finale 300 ml). Dato che la condizione di preadattamento a pH 3,5 raggiungeva carichi più bassi dopo preadattamento, per raggiungere un carico iniziale di circa 8 Log UFC/ml si è partiti da una coltura di 300 ml, che dopo lavaggio e centrifugazione è stato risospeso in circa 100 ml di mosto fermentato e poi inoculato (volume finale 300 ml). L'andamento della FML è stato monitorato con analisi microbiologiche e chimiche dopo 3, 6 e 11 giorni.

## 7.5 Analisi microbiologiche

Per valutare la crescita dei microrganismi utilizzati è stata eseguita la conta delle colonie dopo spatolamento su piastra. Un millilitro di ogni campione, prima del piastramento, è stato diluito con diluizioni decimali seriali in soluzione salina (NaCl 9 g/l). Per quanto riguarda *S. cerevisiae*, all'inizio, durante e alla fine della fermentazione alcolica sono stati prelevati i campioni e sono stati piastrati su YPD agar con aggiunta di cloramfenicolo (0,2 g/l) (per inibire la crescita di batteri). Per valutare la crescita di *O. oeni*, sia durante il preadattamento che durante lo svolgimento della FML, il microrganismo è stato piastrato su MRS con aggiunta di cicloesimide (0,2 g/l) (per inibire la crescita di lieviti). Le piastre di *S. cerevisiae* sono state incubate per 36 ore a temperatura ambiente, mentre le piastre di *O. oeni* sono state incubate per 36 ore a 30°C in anaerobiosi. Dopo l'incubazione è stata eseguita la conta delle colonie e si è risaliti al carico di unità formanti colonia (UFC) per ml di campione.

## 7.6 Analisi chimiche

Al fine di seguire lo svolgimento della fermentazione malolattica occorreva monitorare il calo dell'acido L-malico ed il rispettivo aumento dell'acido lattico, per questo sono state prelevate aliquote di circa 50 ml da ogni condizione sperimentale al momento dell'inoculo dei batteri lattici e dopo 3, 6 e 11 giorni di FML. Le analisi sono state eseguite inserendo il campione nello strumento Bacchus 3 (Steroglass), un analizzatore enologico che permette la valutazione dei principali parametri di mosti e vini, grazie all'analisi del campo spettrale del medio Infrarosso e della quantificazione dello spettro mediante calcolo matematico (FTIR – Trasformata di Fourier). Lo strumento comprende uno spettrofotometro (iS5 FTIR Thermo Fisher Scientific; software Nicolet EZ-Omic FITR), un modulo UV/Visibile rilevatore dello spettrofotometro ad alta sensibilità, un interferometro ThermoNicolet IS5 un controllo di automazione e modulo di comando. È in grado di fornire simultaneamente l'integrale IR, UV e spettri di assorbanza visibile. I dati vengono poi elaborati con il software Bacchus Analysis. In modo particolare, per questa tesi, lo strumento è stato utilizzato per valutare i seguenti parametri riportati con accuratezza riferita in deviazione standard: grado alcolico ( $\pm 0,05$  %), zuccheri ( $\pm 0,30$  g/l), pH ( $\pm 0,035$ ), acidità volatile ( $\pm 0,07$  g/l), acido malico ( $\pm 0,15$  g/l), lattico; grado alcolico potenziale.

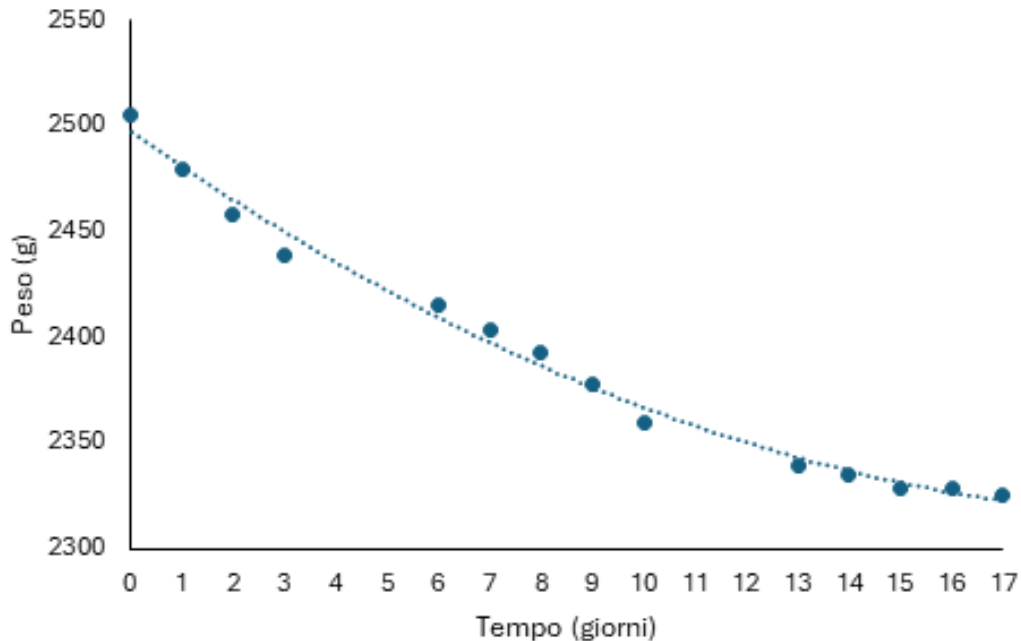
## **7.7 Analisi statistica**

Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato e i risultati riportati sono una media di tali ripetizioni. I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando un'ANOVA a una via (Statistica 8.0, Tulsa, OK, USA). Le differenze tra i valori medi sono state rilevate tramite il test HSD di Tukey e le valutazioni sono state effettuate su un livello di significatività di  $p \leq 0,05$ .

## CAPITOLO 8 – Risultati

### 8.1 Fermentazione alcolica

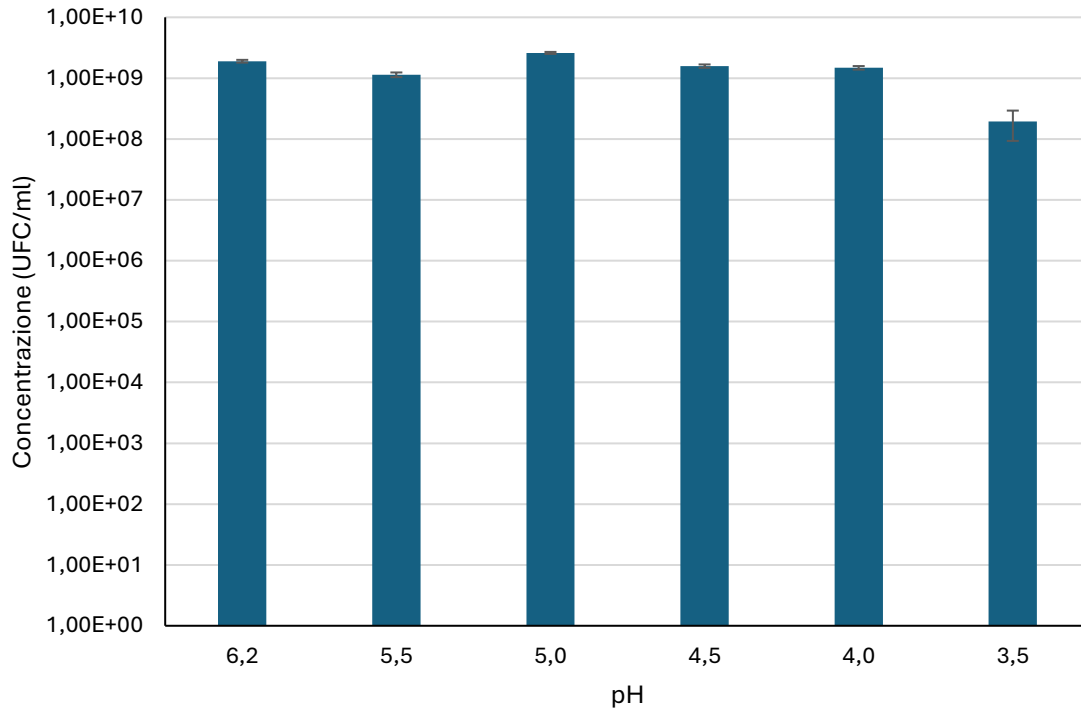
La fermentazione alcolica è stata seguita valutando il calo peso del contenitore in cui era stato inserito mosto sintetico inoculato con il ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae* ad una concentrazione di  $7.11 \pm 0.04$  Log UFC/ml. Come è possibile osservare dalla figura 11, già a 16 giorni il peso del mosto si era stabilizzato, indicando una possibile fine della fermentazione alcolica. Al giorno 17 la concentrazione di *S. cerevisiae* era di  $8.33 \pm 0.20$  Log UFC/ml. Seppur da analisi chimiche, si è osservato che il contenuto in zuccheri non era stato completamente svolto data la presenza ancora di 6,12 g/l di zucchero riducenti e un grado alcolico di 12,3%, si è comunque deciso di inoculare il mosto fermentato con *O. oeni* preadattato ai vari pH.



**Figura 11.** Calo in peso registrato durante lo svolgimento della fermentazione alcolica.

## 8.2 Preadattamento di *Oenococcus oeni* a diversi pH

*O. oeni* 31 è stato preadattato in terreno sintetico (MRS) a diversi gradi di acidificazione. In particolare, i pH testati sono stati: 6,2 (pH standard di MRS), 5,5, 5,0, 4,5, 4,0 e 3,5 (pH ottimale per *O. oeni* in FML).

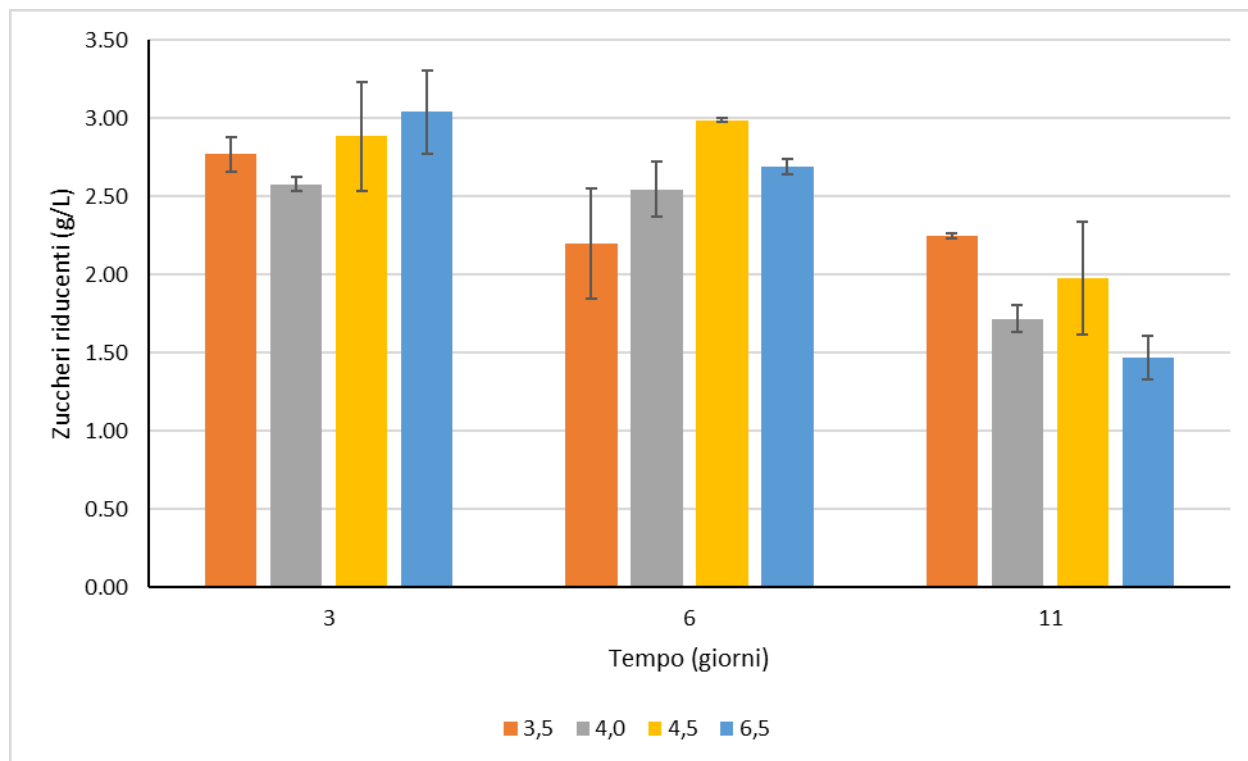


**Figura 12.** Concentrazione di *O. oeni* a seguito di incubazione in MRS per 36h a vari pH.

Dopo due successivi rinfreschi, la concentrazione microbica è stata valutata tramite spatolamento su piastra. Come si può vedere dalla figura 12, l'abbassamento del pH fino a 4,0 non ha avuto un impatto significativo sulla crescita microbica dato che la carica finale aveva raggiunto 9.06-9.41 log UFC/ml in tutti i campioni. Al contrario, l'incubazione a pH 3,5 ha rallentato la crescita di *O. oeni* che si è fermato a  $8.29 \pm 0.02$  log UFC/ml (differenza di circa 1 log). Dato che sopra pH 4,0 non sono state osservate differenze di coltivabilità e i vini generalmente hanno un pH massimo di 4,0, le condizioni di preadattamento considerate nelle prove successive sono poi state solo quelle a pH di 4,5, 4,0 e 3,5, oltre al campione a pH di 6,5.

### 8.3 Fermentazione malolattica

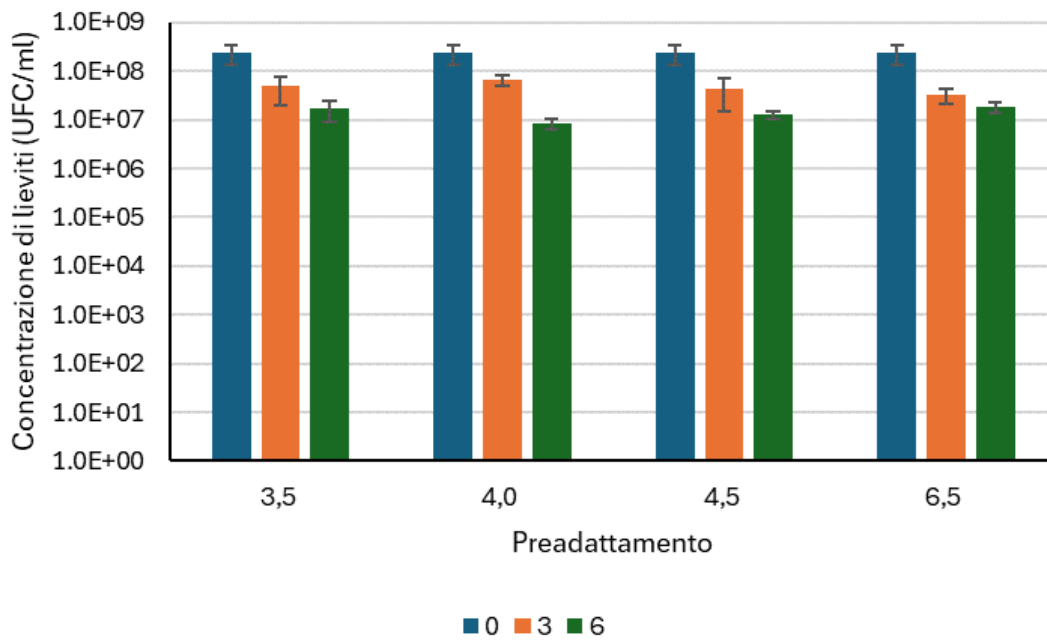
Come era possibile immaginare, anche dopo l'aggiunta dello starter per la FML, la fermentazione alcolica è continuata ad avvenire. Infatti, da un lato si è assistito ad un aumento del grado alcolico fino al 13% (v/v) e dall'altro ad una diminuzione della concentrazione di zuccheri riducenti (Fig. 13). Nell'arco degli 11 giorni di analisi la maggior riduzione è stata osservata nel campione contenente il co-starter non preadattato (pH 6,5).



**Figura 13.** Concentrazione degli zuccheri riducenti a 3, 6 e 11 giorni dopo l'inoculo di *O. oeni* preadattato a diversi pH.

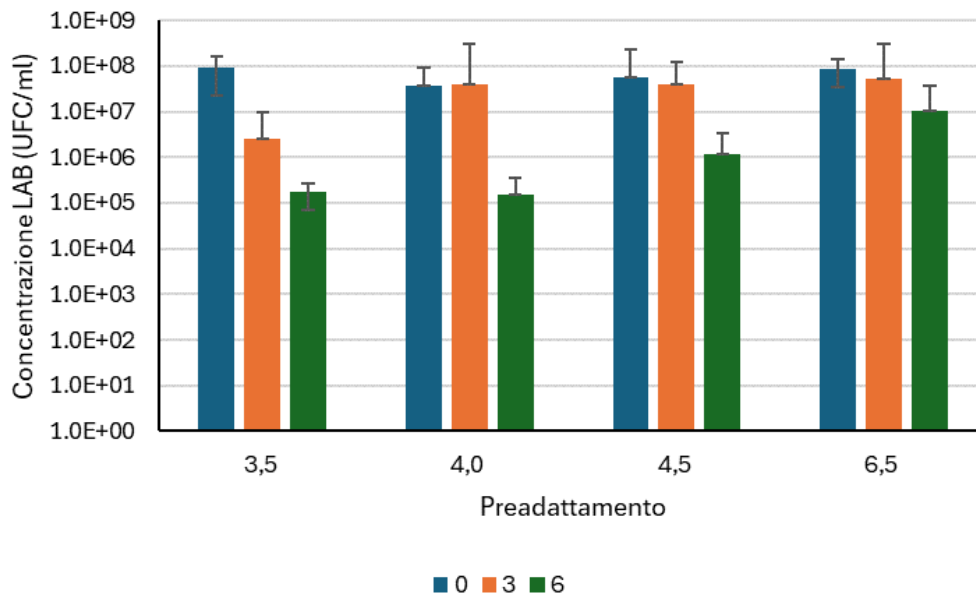
Da un punto di vista microbiologico, la concentrazione dei lieviti (8.37 log UFC/ml a fine fermentazione alcolica) si è ridotta a circa 7.67 e 7.14 log UFC/ml, dopo 3 e 6 giorni dall'inoculo di *O. oeni*, in tutte le tesi considerate senza particolari differenze tra i campioni (Fig. 14).





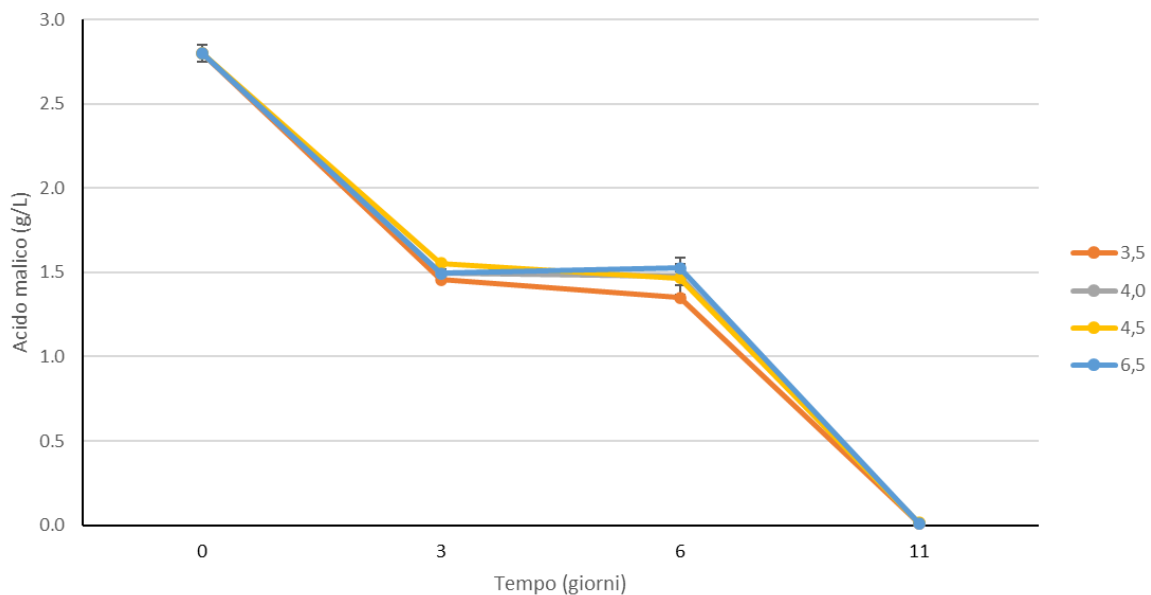
**Figura 14.** Concentrazione di *S. cerevisiae* nei vari campioni dopo 3 e 6 giorni dall'inoculo del co-starter preadattato a diversi pH.

Per quanto riguarda il co-starter (Fig. 15), la sua concentrazione iniziale variava da 7.57 a 7.97 log UFC/ml in tutti i campioni testati. Durante la FML, la concentrazione di *O. oeni* ha subito lievi variazioni per quasi tutte le condizioni testate ad eccezione di quella contenente il ceppo preadattato a pH 3,5. In questo caso, infatti, la sua concentrazione si è ridotta di circa 1.5 log già dopo 3 giorni. Un ulteriore decremento della vitalità per *O. oeni* si osservato dopo 6 giorni di FML per tutte le condizioni sperimentali, con andamenti diversi per i vari campioni. In particolare, il minore decremento in termini di carico cellulare si è evidenziato per il campione non preadattato (-1 log), seguito dal campione 4,5 (-2 log). Differentemente, i campioni preadattati a pH di 3,5 e 4,0 hanno riportato i maggiori decrementi (-3 log) rispetto al tempo iniziale, non evidenziando differenze significative tra questi 2 campioni.

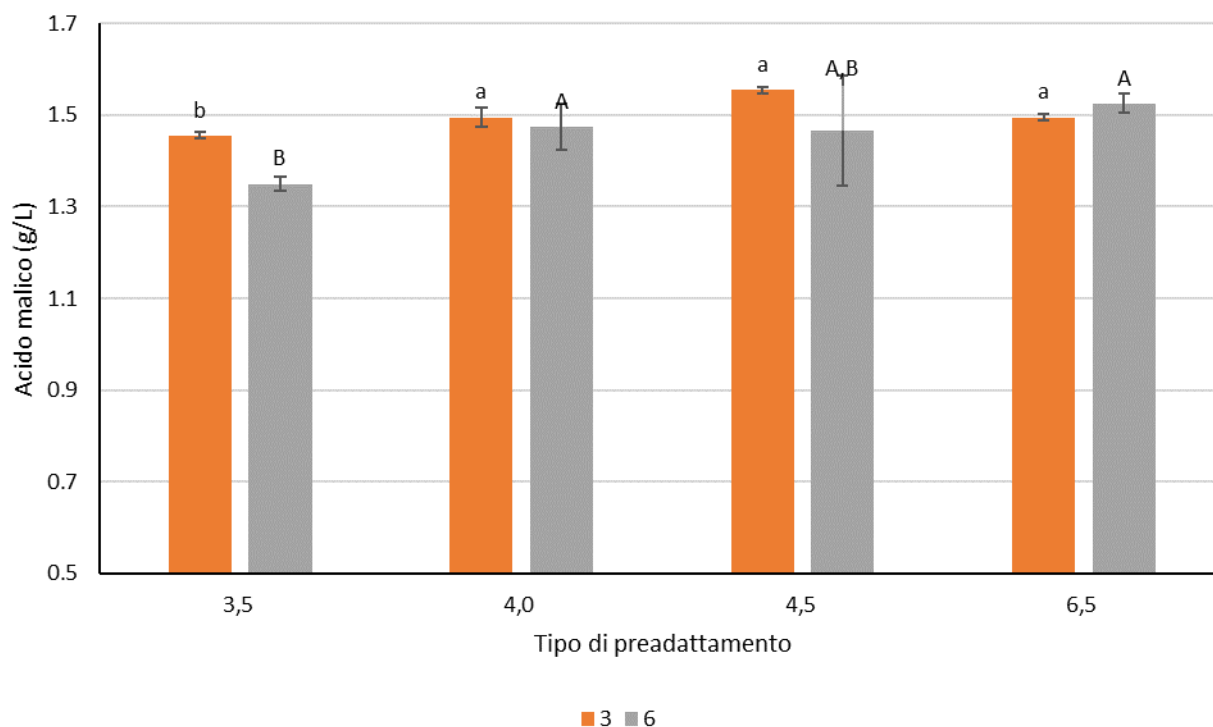


**Figura 15.** Concentrazione di *O. oeni* preadattato a diversi pH nel tempo.

Per valutare lo svolgimento della FML, i campioni sono stati analizzati mediante analizzatore infrarosso per determinare la concentrazione di acido L-malico. L'acido L-malico era presente ad una concentrazione di 2,8 g/l a fine fermentazione alcolica che si è ridotta a valori prossimi allo 0 dopo 11 giorni di FML (Fig. 16).

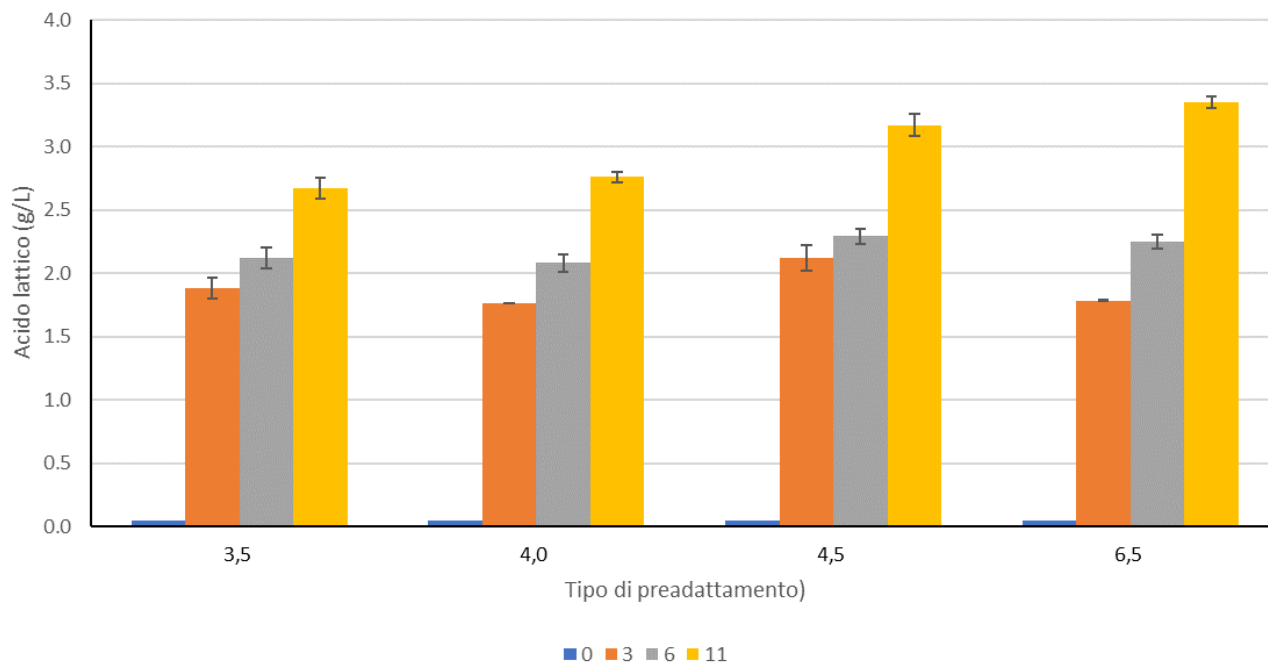


**Figura 16.** Concentrazione dell'acido L-malico durante gli 11 giorni di FML effettuata con *O. oeni* preadattato a diversi pH.



**Figura 17.** Concentrazione dell'acido L-malico al giorno 3 e 6 della FML effettuata con *O. oeni* preadattato a diversi pH.

Andando a focalizzarsi ai giorni 3 e 6 della FML (Fig. 17), si può osservare come i valori di acido malico si siano particolarmente ridotti nel campione inoculato con *O. oeni* preadattato a pH 3,5. Infatti, in questo campione l'acido malico si è ridotto del 48 e 51% dopo 3 e 6 giorni. In tutti gli altri campioni preadattati a pH 4,0, 4,5 e 6,5 si è osservata una riduzione da un minimo del 44 ad un massimo del 47% anche dopo 6 giorni di incubazione.

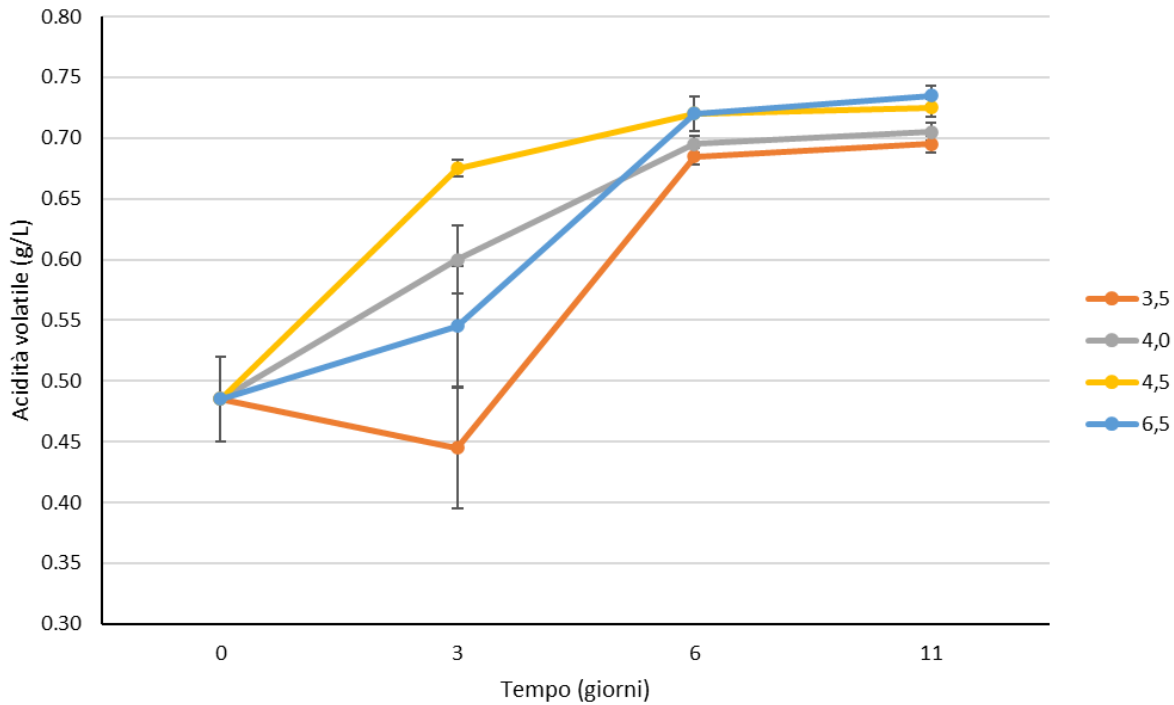


**Figura 18.** Concentrazione di acido lattico durante la FML nelle varie condizioni ottenute inoculando *O. oeni* preadattato a diversi pH.

La FML comporta una conversione di L-malico in L-lattico. Quindi, oltre a valutare il consumo del malico si è valutata anche la concentrazione dell'acido lattico nel tempo (Fig. 18). I dati hanno evidenziato come tale acido sia aumentato in tutti i campioni, in modo particolare in quelli contenenti *O. oeni* preadattato a pH 4,5 e 6,5 (concentrazione superiore a 3 g/l dopo 11 giorni). Tuttavia, se si considera che da 1 mole di acido malico si produce 1 mole di acido lattico, partendo da 2,8 g/l di malico si possono ottenere massimo 1,8 g/l di acido lattico. Questi sono i valori osservati indicativamente in tutti i campioni dopo 3 giorni di FML. Questo implica che l'acido lattico misurato debba derivare anche da altre vie metaboliche. *O. oeni* può produrre L-lattico partendo da acido L-malico ma anche acido D-lattico a partire dagli zuccheri. Pertanto, si può ipotizzare che *O. oeni* preadattato a pH di 6,5 e 4,5 abbia sfruttato maggiormente gli zuccheri riducenti presenti mentre i co-starter preadattati a pH più bassi hanno prodotto meno acido lattico seguendo questa via.

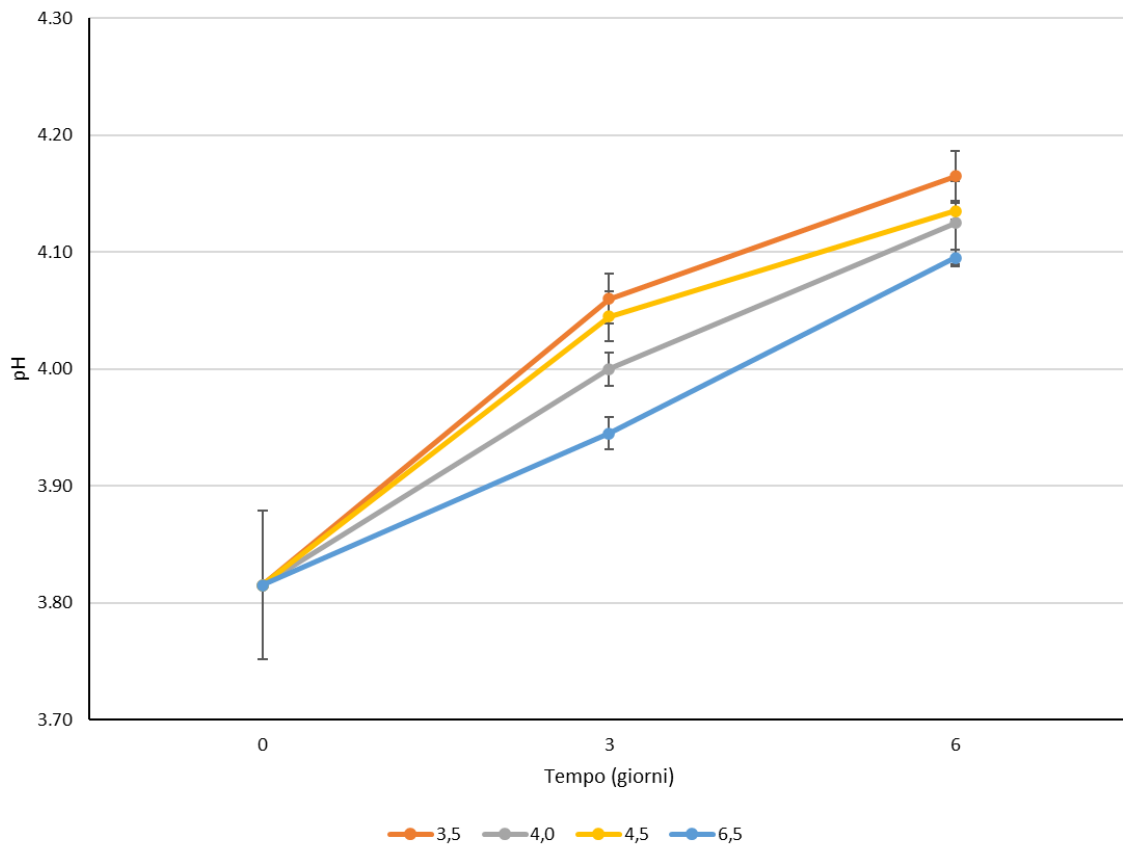
A supportare l'ipotesi che i livelli di acido lattico dipendessero non solo dalla FML in senso stretto ma anche dal metabolismo degli zuccheri, lo si evince dai valori di acidità volatile. Infatti,

un aumento dell'acidità volatile è stato osservato in tutti i campioni, specialmente quelli a pH 4,5 e 6,5 (Fig. 19). Dopo 3 giorni di fermentazione, il ceppo preadattato a pH 3,5 era quello in cui si osservava la minor formazione di acidità volatile (0,44 g/l) rispetto agli altri campioni in cui era superiore a 0,54 g/l.



**Figura 19.** Acidità volatile dei campioni inoculati con *O. oeni* preadattato a diversi pH.

Dato che la FML viene anche definita una disacidificazione biologica del vino, si è valutato l'andamento del pH. In particolare, da figura 20, si può vedere come soprattutto il campione inoculato con il co-starter preadattato a pH 3,5 ha permesso un aumento di circa 0,2 punti di pH già dopo 3 giorni di incubazione e di 0,35 dopo 6 giorni. Tutti gli altri campioni hanno disacidificato meno, soprattutto quello inoculato con *O. oeni* non preadattato.



**Figura 20.** Andamento del pH dei campioni inoculati con *O. oeni* preadattato a diversi pH.

## CAPITOLO 9 – Conclusioni

Lo scopo di questa tesi era quello di valutare l'impatto di un preadattamento di *O. oeni* a diversi pH prima di essere utilizzato come co-starter per la FML. Dai risultati si è osservato che effettivamente il preadattamento a pH acidi, soprattutto pH 3,5 per 24-48h, ha determinato cambiamenti fisiologici nelle cellule capaci di favorire la FML. Infatti, i batteri preadattati a pH 3,5 hanno consumato più acido malico (52%) rispetto alle altre condizioni (47%) già dopo 6 giorni di incubazione. Tuttavia, la presenza di zucchero (circa 6 g/l) durante l'inoculo co-starter, ha indotto i LAB a intraprendere anche la via eterolattica, oltre che quella malolattica, generando più acido lattico rispetto alla resa teorica. Questo è stato osservato soprattutto nei campioni inoculati con *O. oeni* preadattato a pH 6,5 e 4,5. Tuttavia, il consumo di zuccheri da parte dei LAB non sembra aver compromesso la capacità di *S. cerevisiae* di portare a termine la fermentazione alcolica, dato che dopo 6 giorni dall'inoculo del co-starter, si è arrivati ad un tenore alcolico del 13% e valori di zuccheri sotto i 3 g/l. Il fatto che in alcune condizioni i LAB abbiano effettuato maggiormente la fermentazione eterolattica è osservabile supportato dai livelli di acidità volatile misurati che erano maggiori nei campioni con inoculi preadattati a pH 6,5 e 4,5. È anche importante far notare che i ceppi di *O. oeni* preadattati a pH più bassi sono andati incontro ad una maggiore riduzione di vitalità che può avere comunque contribuito ad un minor aumento dell'acidità volatile. Le analisi previste riguardanti il profilo in molecole volatili fornirà informazioni aggiuntive sui possibili sottoprodotti metabolici ottenuti nei diversi campioni.

In conclusione, seppur è necessario effettuare ulteriori studi che considerino l'impiego di mosti più complessi e reali, i dati ottenuti fino ad ora fanno ipotizzare che il preadattamento dei batteri a pH di 3,5 possa promuovere la FML sfavorendo invece il procedere, in parallelo, della fermentazione eterolattica. Da un punto di vista applicativo, questo consentirebbe di aggiungere il co-starter anche in fasi più precoci e non solo al completamento della fermentazione alcolica.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International journal of food microbiology*, 93(2), 141-154.
- Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Bordons, A., & Reguant, C. (2009). Detection of arc genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1841-1847.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2004). The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International journal of food microbiology*, 96(3), 235-252.
- Bauer, R., & Dicks, L. M. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. - *South African Journal of Oenology and Viticulture*, 25(2), 74-88
- Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., & de Revel, G. (2008). Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food microbiology*, 25(1), 99-104.
- Cañas, P. M. I., Romero, E. G., Pérez-Martín, F., Seseña, S., & Palop, M. L. (2015). Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Science and Technology International*, 21(3), 203-212.
- Capucho, I., & San Romao, M. V. (1994). Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 391-395.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. N., & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165-178.
- Coetzee Z. 2013 Site and vintage response of malic and tartaric acid in *Vitis vinifera* L. cv's Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc - Thesis (MScAgric)-Stellenbosch University



- Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Carafa, T., & Garcia-Moruno, E. (2019). An overview on biogenic amines in wine. *Beverages*, 5(1), 19.
- Cox, D. J., & Henick-Kling, T. (1989). Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 171(10), 5750-5752.
- de la Torre, C. A. L., & Conte-Júnior, C. A. (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Brazilian journal of veterinary research and animal science*, 50(6), 430-446.
- Devi, A., & Anu-Appaiah, K. A. (2018). Diverse physiological and metabolic adaptations by *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* in response to the phenolic stress during wine fermentation. *Food Chemistry*, 268, 101-109.
- Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Rauhut D., Knoll C., Krieger-Weber S. (2017) Fermentazione malolattica – Uno strumento per ridurre l’acidità e migliorare l’aroma nei climi freschi - [www.infowine.com](http://www.infowine.com) - Rivista internet di viticoltura ed enologia 10/2
- Duan, W., Roddick, F. A., Higgins, V. J., & Rogers, P. J. (2004). A parallel analysis of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> formation by brewing yeast in response to sulfur-containing amino acids and ammonium ions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62(1), 35-41.
- García-Ruiz, A., Bartolomé, B., Cueva, C., Martín-Álvarez, P. J., & Moreno-Arribas, M. V. (2009). Inactivation of oenological lactic acid bacteria (*Lactobacillus hilgardii* and *Pediococcus pentosaceus*) by wine phenolic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3), 1042-1053.
- Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L., & Vincenzini, M. (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current microbiology*, 44, 374-378.
- Guilloux-Benatier M., Alexandre H., Remize F., Guzzo J. 2002 Interazioni tra lieviti e batteri e pratiche enologiche – [Vinidea.net](http://Vinidea.net) – Rivista internet tecnica del vino 5
- Guzzon R., Malacarne M., Moser S., & Larcher R. (2014). Lieviti e batteri insieme – *VQ* 10(6), 48-50.

- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., Du Toit, M., & Rauhut, D. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1143-1153.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D., & Du Toit, M. (2011). Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2077-2086.
- Krieger-Weber, S., Heras, J. M., & Suarez, C. (2020). *Lactobacillus plantarum*, a new biological tool to control malolactic fermentation: A review and an outlook. *Beverages*, 6(2), 23.
- Lakso, A. N., & Kliewer, W. M. (1975). The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries: I. Enzyme responses. *Plant physiology*, 56(3), 370-372.
- Lerm E., Engelbrecht L., & Du Toit M. (2010) Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF - *South African Journal of Oenology and Viticulture*, 31(2), 186-212
- Liu, S. Q. (2002). Malolactic fermentation in wine—beyond deacidification. *Journal of applied microbiology*, 92(4), 589-601.
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(4), 856-873.
- Lombardi, S. J., Pannella, G., Iorizzo, M., Testa, B., Succi, M., Tremonte, P., Sorrentino E., Di Renzo M., Strollo D. & Coppola, R. (2020). Inoculum strategies and performances of malolactic starter *Lactobacillus plantarum* M10: Impact on chemical and sensorial characteristics of Fiano Wine. *Microorganisms*, 8(4), 516.
- Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, 85(5), 1185-1196.

- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A., & Lonvaud-Funel, A. (2000). Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *Journal of applied microbiology*, 88(4), 584-593.
- Osborne, J. P., Mira de Orduña, R., Pilone, G. J., & Liu, S. Q. (2000). Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), 51-55.
- Pardo I., Ferrer S. (2021). White Wine technology. Elsevier Inc. Chapter 14, 177-181.
- Park, H., & Bakalinsky, A. T. (2000). SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16(10), 881-888.
- Petruzzi, L., Capozzi, V., Berbegal, C., Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Spano, G., & Sinigaglia, M. (2017). Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Frontiers in microbiology*, 8, 995.
- Popescu-Mitroi, I., Radu, D., & Stoica, F. (2014). The study of glycerol metabolism in the malolactic fermentation of red wines. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(1), 9019-9027.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. (2021). Trattato di enologia 1. Edagricole p. 59-60, 72, 89, 130-132, 145-166, 169-177, 183-187, 410-415, 446.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2021). Trattato di enologia 2. Edagricole p. 5, 60-61, 124-126.
- Schumacher, R. L., Gardin, J. P. P., Colimo, A. G. S. C., Bettoni, J. C., & Messerschmidt, I. (2012). Compostos nitrogenados do vinho: fatores envolvidos na formação de aminoácidos e amins biogênicas. *Evidência, Joaçaba*, 12(2), 137-154.
- Silvano A., Deleris-Bou M., Krieger-Weber S. (2016). L'influenza dei batteri enologici sul profilo sensoriale dei vini bianchi: dalla scienza alla degustazione OICCE times - numero 68 anno XVII

Silveira, M. G., Baumgärtner, M., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2004). Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2748-2755.

Sumby, K. M., Bartle, L., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2019). Measures to improve wine malolactic fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 2033-2051.

Sumby, K. M., Jiranek, V., & Grbin, P. R. (2013). Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food chemistry*, 141(3), 1673-1680.

Suzzi e Tofalo *Microbiologia enologica* (2021). Edagricole (seconda edizione) p. 4-5, 20, 41, 119-137, 176-180.

Virdis, C., Sumby, K., Bartowsky, E., & Jiranek, V. (2021). Lactic acid bacteria in wine: Technological advances and evaluation of their functional role. *Frontiers in Microbiology*, 11, 612118.

Waterhouse A.L., Sacks G.L., Jeffery D.W. (2016). *Understanding wine chemistry*. New York: JohnWiley & Sons, Incorporated p.57