

QUALITÀ E SALUBRITÀ IN VINIFICAZIONE

AGENTI DI BIOCONTROLLO

contro le contaminazioni
microbiche

>> Raffaele Guzzon

Tra le bevande alcoliche il vino ha un ruolo peculiare in quanto considerato da molti consumatori più un «alimento» che una «bevanda». Da questa percezione deriva un'attenzione particolare per la salubrità del vino che non si rincontra, ad esempio, nel settore della birra o dei super alcolici e parallelamente una percezione a volte attenuata dei rischi che l'eccesso nel consumo può provocare.

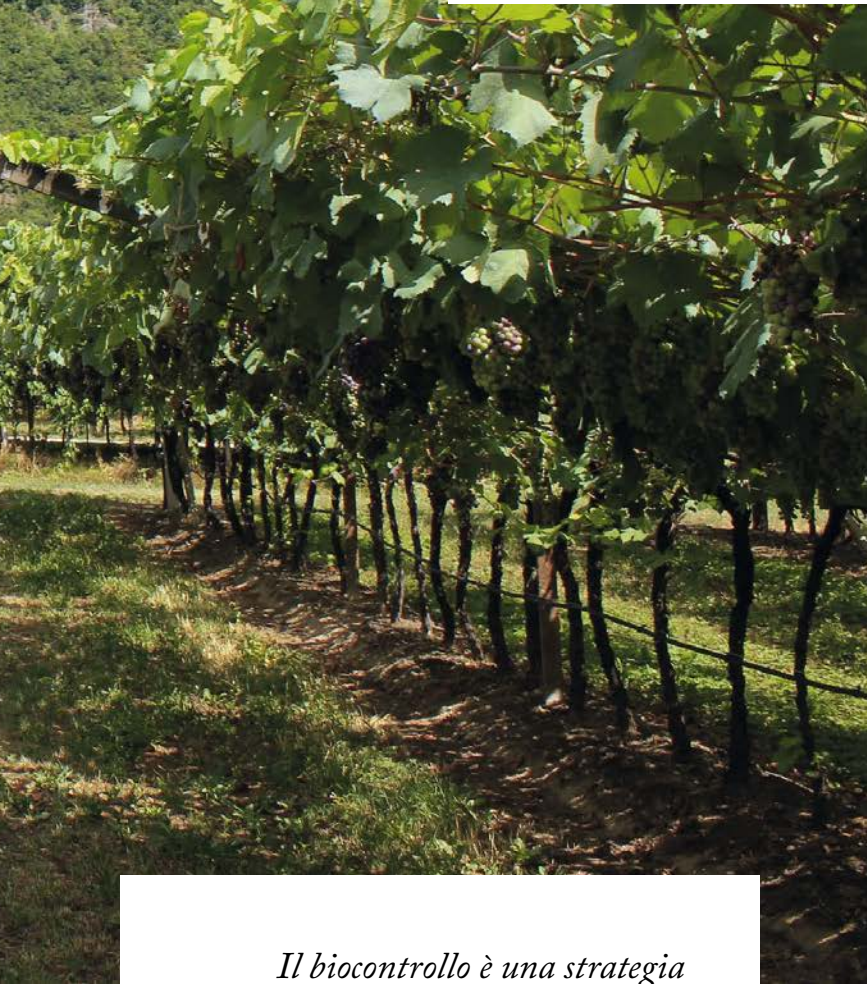
Non è proposito di questa nota addentrarsi negli aspetti nutrizionali, quanto offrire una panoramica su approcci innovativi alla prevenzione delle alterazioni microbiologiche, con l'obbiettivo di ridurre l'utilizzo di anidride solforosa o altri conservanti e, nel contempo, garantire l'assenza di molecole tossiche o sgradevoli, prodotte da microrganismi che possono contaminare i vini. Il tratto comune tra le esperienze che andremo a descrivere è il meccanismo di contrasto ai micror-



ganismi alterativi, ovvero il biocontrollo.

Per biocontrollo si intende l'attività di una specie di microrganismi, utile tecnologicamente o semplicemente non alterativa, capace di inibire lo sviluppo, e dunque l'attività deleteria, di microbi alterativi. I meccanismi sui quali si basa il biocontrollo sono differenti tra loro. Si va dalla semplice

colonizzazione dell'ambiente, nel nostro caso i vini o i mosti, con una competizione per le fonti nutrizionali tra microrganismi utili e alterativi, a trasformazioni indotte dai microrganismi utili (si pensi all'acidificazione o all'accumulo di etanolo), che rendano l'ambiente inadatto alla sviluppo dei lieviti o dei batteri dannosi. In alcuni casi si osserva la produzione di tossine, attive verso una specie microbica e capaci di inibirne selettivamente lo sviluppo.



Il biocontrollo è una strategia per il contenimento dei microbi alterativi che, da un lato, consente una protezione efficace nelle prime fasi della vinificazione e, dall'altro, non altera il successivo processo di affinamento del vino

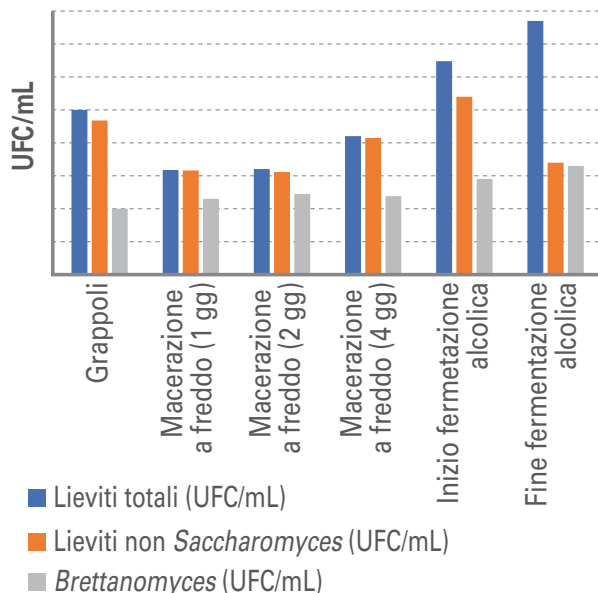
PRIMA È MEGLIO, L'USO DEI LIEVITI PER IL BIOCONTROLLO

Il primo strumento di biocontrollo sono i lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*, impiegati per l'avvio della fermentazione alcolica, o specie dalla provata attività fermentativa, meno diffuse, come *Torulaspora delbruekii*.

Il meccanismo alla base di questo approccio al biocontrollo è in apparenza semplice, ovvero aggiungere una rilevante quantità di microrganismi utili che, colonizzando rapidamente l'ambiente, scongiurino lo sviluppo di altri microbi alterativi. Tuttavia vi sono alcune criticità che devono essere tenute in considerazione.

Soprattutto negli ultimi anni il carico microbico dell'uva è piuttosto alto, sia per l'andamento climatico in atto sia per la riduzione progressiva nell'impiego di agenti fitosanitari ad azione generalizzata, come il rame. Inoltre, la microflora presente nell'uva è già adattata allo specifico ambiente enologico e dunque tenace nel colonizzare i mosti e i vini. Da non trascurare poi la composizione delle uve, specie se alterate da avversità di natura microbica in vigna. I lieviti selezionati hanno solitamente un'elevata esigenza nutrizionale data sia dall'alta concentrazione cellulare sia dall'efficiente metabolismo fer-

G.1 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE DI LIEVITI TOTALI E DI *BRETTANOMYCES* DURANTE LA CRIOMACERAZIONE E LE PRIME FASI DELLA VINIFICAZIONE

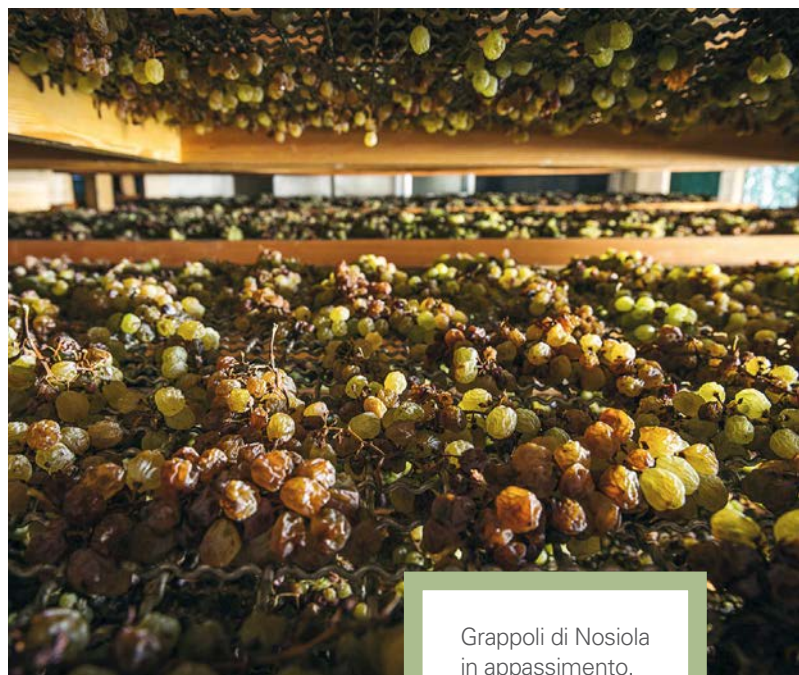


Ufc = unità formanti colonia.
Fonte: modificato da Renouf, 2015.

Nonostante le basse temperature assicurate dalla criomacerazione lieviti come *Brettanomyces* o *Schizosaccharomyces* possono moltiplicarsi, sebbene lentamente.

mentativo. Se non si supportano adeguatamente i loro requisiti in termini di fonti azotate e nutrienti il rischio di uno scarso attecchimento di queste colture è molto alto. Le strategie più attuali prevedono l'inoculo precoce dei lieviti selezionati, in parte già sulle uve se queste sosterranno a lungo prima della lavorazione, e comunque direttamente alla pigiatura, indipendente dal fatto che si voglia un pronto avvio della fermentazione o invece si intenda attuare una macerazione a freddo. Infatti, anche durante la conservazione a bassa temperatura si possono osservare nel mosto sviluppi microbici che andranno a condizionare l'andamento delle fermentazioni, una volta ripristinata la corretta temperatura, dato che lieviti come *Brettanomyces* o *Schizosaccharomyces* possono moltiplicarsi, sebbene lentamente, anche a basse temperature (grafico 1).

Un'altra possibilità, recentemente apparsa sul mercato, è quella di favorire il controllo microbiologico innalzando per via biologica l'acidità di mosti poveri in acidi organici, utilizzando lieviti privi di attività fermentativa, ma in grado di accumulare acidi come il lattico. In questo senso sono oggi disponibili sul mercato ceppi di *Lachancea thermotolerans* e in passato è stato proposto



Grappoli di Nosiola in appassimento. Cantina Toblino

Foto: Carlo De Biasi

l'utilizzo di *Schizosaccharomyces pombe*, lievito in grado di accumulare acido lattico per via malo-alcolica. Anche per chi non intende utilizzare lieviti selezionati un'attenta gestione dell'avvio delle fermentazioni può essere di aiuto.

PIED DE CUVE

Una strategia utile in questo caso è selezionare naturalmente una popolazione di lieviti a elevata vigoria fermentativa mediante la preparazione di un pied de cuve, alcuni giorni prima della vendemmia. Si potrà così arricchire la microflora utile senza minare la biodiversità naturale delle uve in termini di specie microbiche. Il pied de cuve potrà essere formulato, variando la composizione del mosto con opportune aggiunte, per stimolare i caratteri di maggiore interesse. Sono ad esempio riportate in bibliografia felici esperienze del gruppo di microbiologia agraria dell'Università di Palermo, coordinato dal professor Moschetti, e basate sull'impiego di pied de cuve fortificati per fermentazioni di uve con potenziali alcolici particolarmente elevati. Un altro parametro che frequentemente è corretto nei pied de cuve è l'acidità, mentre la gestione dell'anidride solforosa deve essere particolarmente accorta. L'uso di anidride solforosa nelle fasi iniziali della vinificazione, infatti, oltre a contrastare con l'obiettivo di fondo di ridurre il contenuto nel vino, può essere controproducente per due motivi. Da un lato è un antimicrobico aspecifico, capace di inibire anche

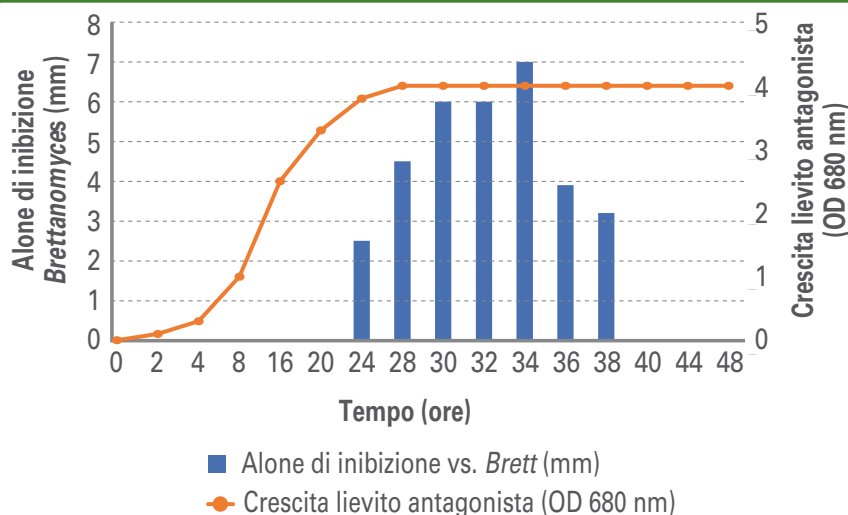
l'attività di microrganismi utili, mentre è provato che lieviti alterativi, come *Brettanomyces*, *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* sono particolarmente tolleranti verso l'anidride solforosa. Inoltre, un eccesso di questo antisettico, unitamente a quanto prodotto dai lieviti durante la fermentazione alcolica, può inibire la fermentazione malolattica, rallentando il naturale processo di stabilizzazione del vino. È dunque opportuno contenere o addirittura evitarne l'impiego prima della fermentazione malolattica e riservare le aggiunte di anidride solforosa alle fasi di affinamento e imbottigliamento del vino.

LE ESPERIENZE CON I LIEVITI NON-SACCHAROMYCES

Brettanomyces è il principale lievito alterativo, capace di produrre non solo molecole maleodoranti, ma anche tossiche, come ammine biogene ed etil-carbammato. Essendo piuttosto tollerante all'anidride solforosa occorre individuare strategie alternative. Diversi lavori scientifici, principalmente pubblicati dall'Università delle Marche dal gruppo di lavoro del professor Ciani, hanno rilevato come alcuni ceppi di lieviti non-*Saccharomyces*, isolabili in mostri e vini, possano contrastare direttamente *Brettanomyces* mediante la produzione di specifiche tossine killer.

Il carattere killer di alcuni ceppi di *S. cerevisiae* è noto da tempo e sfruttato per favorire la prevalenza dei lieviti selezionati sulla microflora indigena dei mosti. Qui sono stati impiegati ceppi di *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* che già dopo 6 ore dall'inoculo hanno manifestato la produzione della tossina con conseguente inibizione dello sviluppo di *Brettanomyces* (grafico 2). Vi sono evidentemente differenze tra i cep-

G.2 CINETICA DI SVILUPPO E CAPACITÀ DI INIBIZIONE DI UN CEPPLO DI *PICHIA ANOMALA* VERSO *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*



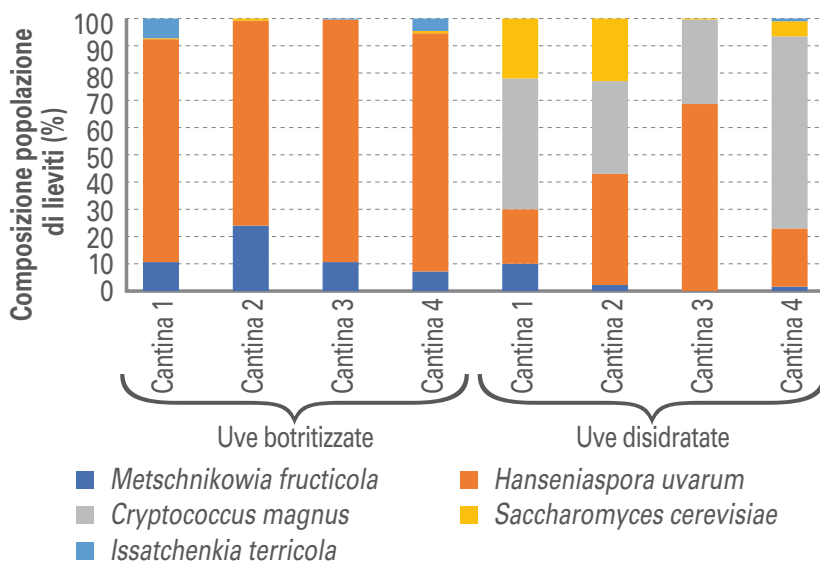
La crescita è misurata in termini di torbidità della soluzione (OD 600), l'inibizione in termini di alone di inibizione inteso come mancato sviluppo di *Brettanomyces* su terreno sintetico.
Fonte: modificato da Comitini *et al.*, 2004.

Alcuni ceppi di lieviti non-*Saccharomyces* possono contrastare direttamente *Brettanomyces* mediante la produzione di specifiche tossine killer; già dopo 6 ore l'inoculo inizia uno sviluppo esponenziale.

pi, *Pichia* si è dimostrata generalmente più rapida nell'inibizione, e solo il 25% dei ceppi testati ha manifestato un'attività di biocontrollo generalizzata verso diversi ceppi di *Brettanomyces*, ma le prospettive sono promettenti perché gli stessi autori, caratterizzando la molecola killer, ne hanno dimostrato la stabilità nel contesto enologico. Ricercatori francesi e anglosassoni hanno focalizzato la loro attenzione sull'azione dei batteri lattici nell'inibire *Brettanomyces* o per lo meno l'accumulo di fenoli volatili. È stato dimostrato che il coinoculo tra lieviti e batteri consente di contenere lo sviluppo di lieviti alterativi sia durante la fermentazione alcolica sia al termine di essa, dato che la fermentazione malolattica si svolge contemporaneamente all'alcolica, consentendo una rapida

stabilizzazione del vino. S'ipotizza che batteri lattici e *Brettanomyces* competano per alcune risorse nutrizionali e dunque un'aggiunta tempestiva di un'elevata popolazione batterica renda l'ambiente, ovvero il vino, meno adatto allo sviluppo di *Brettanomyces*. Riguardo al contenimento dei fenoli volatili un lavoro del 2015, a firma di Chescheir *et al.*, ha osservato come diversi ceppi di *Oenococcus oeni* abbiano un'attività cinnamilesterasica che potrebbe interferire con l'accumulo di fenoli volatili sottraendo precursori all'azione di *Brettanomyces*. I due ricercatori hanno dimostrato che in funzione del ceppo di batteri lattici selezionati utilizzato nella fermentazione malolattica il contenuto in acidi cinnamici e dunque l'accumulo di fenoli vola-

G.3 **COMPOSIZIONE (%) DELLA POPOLAZIONE DI LIEVITI ISOLATI SU UVE DI NOSIOLA POSTE IN APPASSIMENTO SULLE TRADIZIONALI ARELLE PER LA PRODUZIONE DI VIN SANTO TRENINO**



Fonte: modificato da Guzzon et al., 2014.

Si osserva la totale divergenza tra la popolazione microbica di uve semplicemente disidratate e uve bottrizzate.

tile nella successiva conservazione del vino poteva variare in modo anche significativo, a parità delle altre condizioni.

LE ORIGINI DEI CEPPI KILLER, IL CASO DEL VIN SANTO TRENINO

La produzione di vini passiti è pratica tra le più complesse nel settore enologico, sebbene la lunga tradizione che l'accompagna possa portare a credere che questi vini si producano un po' da sé. Ovviamente non è così, anzi lo sviluppo di lieviti e batteri sulle uve in appassimento porta a un consumo di numerosi substrati, rendendo i mosti meno atti alla fermentazione.

Analogo effetto lo hanno alcune tossine prodotte dalle muffe che possono inibire lo sviluppo

dei lieviti o alterarne le prestazioni fermentative, modificando profondamente la microflora presente, ad esempio, sulle uve bottrizzate. I ricercatori della Fondazione Edmund Mach hanno pubblicato nel 2014 su European food research and te-

chnology i risultati di una ricerca volta a caratterizzare i lieviti presenti su uve di Nosiola, poste in appassimento per la produzione di Vino Santo trentino, verificandone l'attitudine a contrastare lo sviluppo di *Botrytis*. L'ipotesi circa l'azione della botrite nel selezionare la microflora è stata confermata dalle osservazioni che hanno dimostrato la totale divergenza tra la popolazione microbica di uve semplicemente disidratate e uve bottrizzate, anche poste sui medesimi graticci per l'appassimento (grafico 3).

Gli stessi ricercatori hanno isolato le specie di lievito dominanti e, mediante una serie di test di inibizione svolti su terreni sintetici per la crescita microbiologica, hanno verificato la capacità di alcuni di questi lieviti di bloccare lo sviluppo della muffa. L'ipotesi è che la coesistenza in natura con botrite abbia selezionato ceppi di lievito non solo resistenti alla muffa, ma anche capaci di contenerne l'azione sia alterando l'ambiente, ad esempio con la produzione di acidi, sia con tossine specifiche.

La coesistenza tra lieviti e batteri utili e specie alterativi impone dunque una selezione reciproca e può portare alla comparsa di microrganismi capaci di inibire





Foto: Carlo De Biasi

altera il successivo processo di affinamento del vino. Quale che sia l'approccio utilizzato dall'enologo avere consapevolezza delle reciproche interazioni tra specie microbiche, naturalmente presenti sulle uve o volutamente aggiunte al mosto o al vino è essenziale per prevederne l'azione e sfruttarne al meglio le intrinseche potenzialità, in un'ottica di aumento della qualità dei vini e riduzione dei preservativi di natura chimica, tra cui primariamente l'anidride solforosa.

Raffaele Guzzon

Centro di trasferimento tecnologico
Fondazione Edmund Mach
San Michele all'Adige (Trento)

*Questo articolo è corredato di bibliografia/contenuti extra. Gli abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su:
www.informatoreagrario.it/bdo*

i fenomeni alterativi senza interferire con il processo di vinificazione, scomparendo quando il tenore di alcol si innalza per effetto della fermentazione alco-

lica. Il biocontrollo è dunque una strategia lungimirante perché da un lato consente una protezione efficace nelle prime fasi della vinificazione e dall'altro non

Agenti di biocontrollo contro le contaminazioni microbiche

BIBLIOGRAFIA

V. Renouf (2015) *Brettanomyces* et phénols volatils. Outils pratiques pour prévenir et limiter les altérations dans les vins. Lavoisier (Paris).

G. Moschetti, O. Corona, R. Gaglio, M. Squadrito, A. Parrinello, L. Settanni, E. Barone, N. Francesca. (2015) Use of fortified pied de cuve as an innovative method to start spontaneous alcoholic fermentation for red winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10.1111/ajgw.12166.

F. Comitini, J. Ingeniis De, L. Pepe, I. Mannazzu, M. Ciani. (2004) *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/*

Brettanomyces spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238, Pages 235–240.

S. Chescheir, D. Philbin, J.P. Osborne (2015) Impact of *Oenococcus oeni* on wine hydroxycinnamic acids and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 357-362.

R. Guzzon, R. Larcher, E. Franciosi (2014) A new resource from traditional wines: characterisation of the microbiota of “Vino Santo” grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *European Food Research and Technology*, 10.1007/s00217-014-2195-y.



www.viteevino.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.