

Impiego di Batteri Malolattici Autoctoni nella Produzione di Montepulciano d'Abruzzo Senza Solfiti

Use of Autochthonous Malolactic Bacteria to Produce SO₂-Free Montepulciano d'Abruzzo Wine

Carlo Perla¹, Noemi Battistelli², Giuseppe Sebastio¹, Claudio Mazzoni¹, Camillo Zulli³, Giulio Andreoli³, Giovanna Suzzi², Rosanna Tofalo²

¹Dalton Biotecnologie S.R.L. Via Italia 87, 65010 Spoltore (PE) – Italia info@dalton.it

²Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Via R. Balzarini 1, 64100 Teramo, Italia

³Cantina Orsogna (Orsogna, CH, Italia)

INTRODUZIONE

La fermentazione malolattica (FML) è un processo condotto dai batteri malolattici (BML) che porta alla decarbossilazione dell'acido L-malico ad acido L-lattico ed anidride carbonica. La FML determina una riduzione dell'acidità e garantisce la stabilità microbiologica del vino. Contemporaneamente modifica positivamente colore, aroma, astringenza e struttura, con variazioni dipendenti dalle proprietà specie e ceppo-specifiche dei BML. La specie più frequentemente associata a tale processo è *Oenococcus oeni*. L'utilizzo di BML selezionati, ancora non particolarmente diffuso in Abruzzo, è una pratica da tempo utilizzata nelle regioni di eccellenza enologica del mondo e consiste nell'inoculo di BML selezionati durante (co-inoculo) o dopo (inoculo sequenziale) la fermentazione alcolica. In realtà, nella pratica, la FML fallisce parzialmente o completamente con una certa frequenza, nonostante l'aggiunta dei BML selezionati. Il fallimento della FML è spesso dovuto alle condizioni proibitive del vino a fine fermentazione alcolica, a sostanze inibenti prodotte dai lieviti e spesso ad una scelta sbagliata del ceppo commerciale che non è in grado di adattarsi alle condizioni di quel particolare vino. L'obiettivo del progetto è quindi di selezionare batteri autoctoni come una valida alternativa agli starter commerciali nell'induzione della FML, senza stravolgere le caratteristiche tipiche del Montepulciano d'Abruzzo.

MATERIALI E METODI

Origine dei ceppi

Dieci presunti ceppi di *O. oeni* (ISO344, ISO345, ISO349, ISO350, ISO351, ISO352, ISO353, ISO358, ISO359, ISO360) sono stati isolati da FML spontanee da Dalton Biotecnologie srl (PE) presso l'azienda Olearia Vinicola Orsogna (CH). Per la crescita e il mantenimento è stato utilizzato MRS addizionato di acido malico (6 g/l), fruttosio (5 g/l), cisteina (0,5 g/l).

Identificazione e tipizzazione

I ceppi sono stati identificati tramite PCR-specie specifica in accordo con Zapparoli et al. (1998). La tipizzazione è stata effettuata mediante RAPD-PCR con l'impiego dell'oligonucleotide M13 in accordo con Tofalo et al. (2009).

Caratterizzazione tecnologica

I ceppi sono stati inoculati in vino sintetico (etanolo 10% v/v, 4 g/l estratto di lievito, 2 g/l glicerolo, 6 g/l acido malico) (Carreté et al. 2002) in diverse condizioni: pH (3 e 3,6), etanolo (10% e 15% v/v) e SO₂ 10 e 50 ppm. La capacità di tollerare e/o crescere alle condizioni testate è stata valutata mediante lettura spettrofotometrica.

Microvinificazioni

Per valutare le prestazioni di fermentazione specifiche di ogni ceppo, le colture sono state utilizzate per microfermentazioni in mosto di Montepulciano d'Abruzzo. Un litro di mosto è stato inoculato con un ceppo di *S. cerevisiae* ad una concentrazione di 10⁹ ufc/ml. I batteri malolattici sono stati inoculati ad una concentrazione finale di 10⁷ ufc/ml 24 ore dopo l'inoculo del lievito (Versari et al. 2015).

Vinificazione in cantina

Il ceppo ISO353 selezionato è stato utilizzato in vinificazioni in cantina con inoculo a due diverse concentrazioni: 40 g/hl e 80 g/hl. L'inoculo è stato effettuato 24 ore dopo l'inoculo di *S. cerevisiae*.

RIFERIMENTI

- Carreté R., Vidal M.T., Bordons A., Constantí M. 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. FEMS Microbiol Lett. 211:155-9
- Tofalo R., Chaves-López C., Di Fabio F., Schirone M., Felis G. E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. Int J Food Microbiol. 130: 179-187
- Versari A., Patrizi C., Parpinello G. P., Mattioli A. U., Pasini L., Meglioli M., Longhini G. 2015. Effect of co-inoculation with yeast and bacteria on chemical and sensory characteristics of commercial Cabernet Franc red wine from Switzerland. J Chem Technol Biotechnol. 91:876-882
- Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. Lett Appl Microbiol. 27: 243-246

RISULTATI E DISCUSSIONE

I ceppi sono stati identificati tramite PCR-specie specifica in accordo con Zapparoli et al. (1998) e tutti i ceppi sono risultati appartenere alla specie *Oenococcus oeni*.

Il polimorfismo degli isolati è stato valutato mediante RAPD-PCR. I risultati ottenuti hanno permesso di differenziare i ceppi individuando 6 profili diversi. Tre ceppi (ISO345, ISO360 e ISO352) hanno mostrato un profilo ceppo specifico (B, D ed F), mostrando differenze sia nel numero che nella dimensione dei frammenti. In generale sono stati individuati 3 profili principali (A, C ed E) contenenti 3 (profilo A), o 2 ceppi (profili C ed E) (Tabella 1).

Profilo	Ceppi
A	ISO344, ISO349, ISO353
B	ISO345
C	ISO350, ISO351
D	ISO352
E	ISO358, ISO359
F	ISO360

Tabella 1. Profili RAPD ottenuti con il primer M13

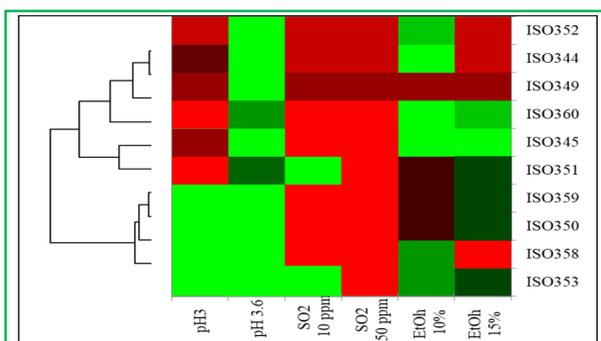


Figura 1. Heatmap relativa alle diverse performance di sopravvivenza dei ceppi testate. Il verde si riferisce a valori maggiori, il rosso a bassi valori. I dati sono stati espressi come log DO_{600nm}T7/DO_{600nm}T0.

È stata valutata la capacità di tollerare e/o crescere a diversi valori di pH, in presenza di etanolo e di SO₂. In generale, i ceppi hanno mostrato migliori cinetiche di sviluppo a pH 3,6. I maggiori valori di DO_{600nm} a pH 3 sono stati raggiunti da ISO353, ISO358, ISO350, ISO359. Lo stress legato alla SO₂ è risultato quello più selettivo. A 10ppm di SO₂ sono risultati in grado di sviluppare solo due ceppi: ISO353 e ISO351, e nessuno a 50 ppm. Tutti i ceppi erano in grado di crescere a concentrazioni di etanolo pari al 10% (v/v) ad eccezione del ceppo ISO349. Ad una concentrazione del 15% (v/v), i ceppi ISO349, ISO358, ISO344 e ISO352 non erano in grado di sviluppare (Fig. 1). I dati ottenuti hanno mostrato che il ceppo ISO353 era quello con le migliori performance di tolleranza.

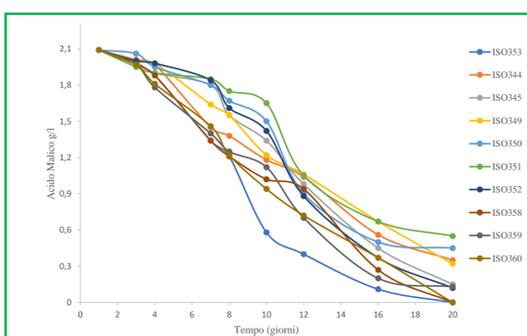


Figura 2a. Degradazione dell'acido malico durante le microvinificazioni dei 10 ceppi di *O. oeni*

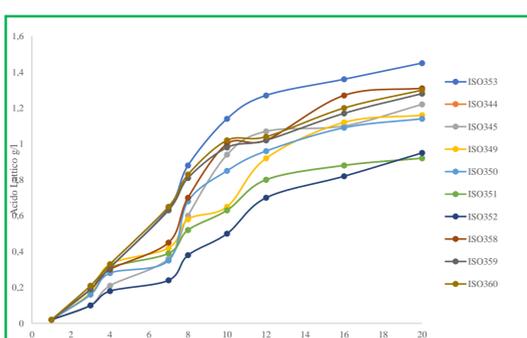


Figura 2b. Produzione di acido lattico durante le microvinificazioni da dei 10 ceppi di *O. oeni*

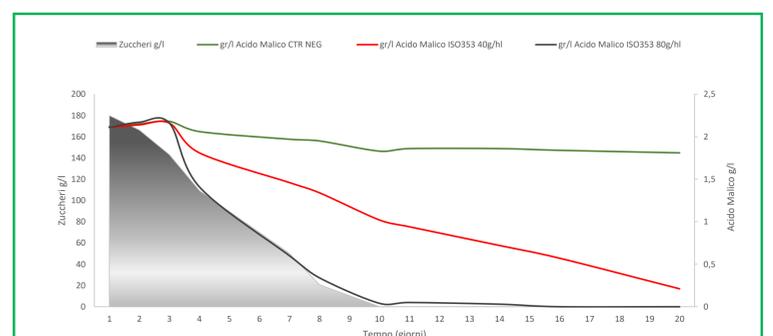


Figura 3. Degradazione dell'acido malico durante la vinificazione in cantina con il ceppo ISO353 inoculato a due concentrazioni (40 g/hl e 80 g/hl).

Per valutare la capacità di degradazione è stato determinato l'acido malico in mosti di Montepulciano, in co-inoculo con un ceppo commerciale di *S. cerevisiae*. I risultati hanno evidenziato che tutti i ceppi erano in grado di effettuare la FML ed il ceppo ISO353 è risultato il ceppo con maggiore attività degradativa (Fig. 2 a,b). L'inoculo è un fattore chiave per il buon andamento della fermentazione malolattica: come atteso 80g/hl è risultato il più efficace in termini di degradazione dell'acido malico nella vinificazione in cantina (Fig. 3). L'impiego di *O. oeni* ISO353 non ha modificato le caratteristiche organolettiche tipiche del Montepulciano d'Abruzzo pur garantendo la FML. In conclusione, i ceppi malolattici autoctoni potrebbero rappresentare una valida alternativa ai ceppi commerciali, valorizzando un vino di pregio come il Montepulciano d'Abruzzo e rafforzando il legame con il territorio.

FINANZIAMENTO



POR FESR Abruzzo 2014-2020 ASSE I – Ricerca Sviluppo Tecnologico e Innovazione – Linea di azione I.1.4: “Sostegno alle attività collaborative di R&S per lo sviluppo di nuove tecnologie sostenibili, di nuovi prodotti e servizi”. “Sostegno a progetti di innovazione delle Grandi Imprese e delle PMI nelle aree di specializzazione S3”. Titolo del progetto: “Sviluppo e validazione di un processo innovativo industriale per la fermentazione malolattica con microrganismi autoctoni in vini Montepulciano d'Abruzzo biologici senza solfiti aggiunti”.