

I CONTROLLI MICROBIOLOGICI

E LA LORO IMPORTANZA PER L'ENOLOGIA DI OGGI E DI DOMANI

La vinificazione è certamente vecchia di millenni, ma l'enologia è una scienza "giovane". Si può dire che abbandonando l'empirismo con la scoperta dei microrganismi da parte del chimico francese Louis Pasteur, universalmente riconosciuto come il padre della microbiologia e della teoria vitalistica. Vale la pena ricordare che la prima pubblicazione di Pasteur era intitolata "Études sur le vin", pubblicato a Parigi nel 1866.

Da allora la microbiologia e lo studio delle fermentazioni hanno assunto un ruolo fondamentale nel settore enologico

La microbiologia enologica, pur avvalendosi delle stesse tecniche di studio e diagnosi della microbiologia generale, interessa un più limitato numero di microrganismi poiché il succo d'uva, a causa del pH relativamente basso, risulta un mezzo fortemente selettivo, escludendo ad esempio tutti i batteri patogeni per l'uomo. Osservando al microscopio del succo d'uva appena spremuto sarà possibile osservare una popolazione microbica poco numerosa e costituita da lieviti e rari batteri e funghi filamentosi. I lieviti sono ampiamente favoriti dalla forte presenza di zuccheri e dalla loro capacità di fermentare, quindi di fare a meno dell'ossigeno. La fermentazione, producendo tenori di alcol generalmente superiori al 10%, determina una ulteriore selezione, limitando la presenza batterica solo ai batteri acetici e ai batteri lattici.

Nonostante tutto appaia relativamente semplice e spontaneo il processo naturale di trasformazione del mosto d'uva in vino non è sempre coronato dal successo: le alterazioni causate da microrganismi che diedero origine agli studi di Pasteur sono ancora oggi



CANDIDA STELLATA

di attualità, anzi possiamo tranquillamente affermare che le "malattie del vino", così le aveva definite, dopo un lungo periodo di remissione, fanno registrare oggi un certa recrudescenza ponendo gli enologi di fronte a problemi apparentemente nuovi. Capita quindi oggi di dover verificare la presenza, proprio nei vini potenzialmente migliori, di alterazioni dai nomi antichi come lo "spunto lattico", il "girato", il "filante", tutti dovuti a diversi generi di batteri lattici, lo "spunto acetico", ovviamente dovuto ai batteri acetici. Ma sono diventati frequenti anche i difetti un tempo considerati "esotici" come il carattere "Brett", dovuto alla subdola presenza di lieviti del genere *Brettanomyces* nei vini.

Le cause di questa recrudescenza possono essere diverse. A partire dai primi anni '90 è iniziata, da parte dei produttori, la ricerca di una maggiore qualità dei vini, basata sulla concentrazione dei caratteri varietali

e sull'ammorbidente dei caratteri sensoriali. Il risultato è stato raggiunto diminuendo la produzione per vite e raggiungendo in miglior grado di maturazione dell'uva. Questo ha comportato un tenore di zuccheri più elevato, una acidità più bassa (pH più alto) e una minore concentrazione di sostanze azotate assimilabili dai lieviti. Nello stesso periodo si sono osservate annate molto calde che hanno accentuato la concentrazione zuccherina. Tale situazione ha messo in gravi difficoltà i lieviti agenti della fermentazione alcolica (*Saccharomyces cerevisiae*). Negli ultimi anni si è anche assistito ad una riduzione del ricorso alla solfitazione, giustificata dalla ricerca di una maggiore naturalità del vino, ma improvvida se non accompagnata da adeguate attenzioni tecniche. Ancora, la selezione delle partite di uve, la fermentazione in piccoli recipienti, il maggiore impiego di recipienti di legno, il lungo soggiorno sul-

le fecce, l'abbandono delle pratiche di filtrazione come simbolo di naturalità, hanno completato un quadro di condizioni determinanti le difficoltà nel completamento della fermentazione alcolica, quindi la presenza di residui di zuccheri che favoriscono l'insorgere di alterazioni batteriche e lo sviluppo di *Brettanomyces*.

In queste circostanze la precoce diagnosi delle alterazioni microbiche diviene per l'enologo un'assoluta necessità per prevenire danni spesso irreparabili.

In molti casi una semplice osservazione al microscopio ottico, opportunamente attrezzato per consentire l'osservazione diretta del classico preparato in goccia schiacciata, è sufficiente a consentire una valutazione della quantità e qualità della microflora presente, consentendo una diagnosi veloce ed efficace.

I lieviti sono generalmente prevalenti quando si osservano al microscopio ottico mosti in fermentazione o vini alla svinatura. In questo caso non si può ovviamente parlare di una classificazione, ma di un possibile riconoscimento basato sulla forma delle cellule (ellittici, apiculati, ogivali ..). E' bene precisare che in una osservazione diretta, per individuare i batteri, molto più piccoli dei lieviti, occorre essere dotati di un microscopio a contrasto di fase che consenta almeno 1000 ingrandimenti.

Naturalmente non basta vedere quali forme sono presenti, ma nel corso della fermentazione è necessario sapere quante cellule ci sono e valutare grossolanamente la loro vitalità sulla base della percentuale di cellule gemmanti. A questo scopo si impiega la camera conta globuli di Burkner. Questa è costituita da un vetrino rettangolare, con lati rispettivamente di 7,5 cm e 3,5 cm e uno spessore di 4 mm. Presenta 2 celle che hanno una profondità di 0,1 mm e il piano di ogni cella risulta diviso in 9 quadrati di lato 1 mm. All'interno di ognuno di questi quadrati è possibile vedere al microscopio il disegno di altri quadrati che con la loro presenza aiutano nel conteggio delle cellule. Tenendo conto della eventuale diluizione è possibile risalire alla concentrazione della popolazione microbica nel campione. Il conteggio può rivelarsi particolarmente utile nel caso di un arresto di fermentazione per verificare l'effettiva carica microbica del vino, anche se il metodo non consente di distinguere le cellule vitali da quelle inattive e, ovviamente, non dà informazioni sulle possibili cause dell'arresto di fermentazione. Il prelievo del campione deve prevedere l'uso di pipette sterili dopo aver effettuato l'omogeneizzazione della massa in esame.

L'esame microscopico non permette un'effettiva individuazione delle specie di lieviti presenti nel mosto o

nel vino, motivo per cui da molti anni sono disponibili metodiche più accurate basate sia sull'utilizzo di piastre Petri e terreni microbiologici selettivi, ma, in tempi più recenti, metodiche di biologia molecolare che basandosi sull'analisi del DNA consentono identificazioni univoche e sicure.

Il controllo della stabilità microbiologica dei vini imbottigliati, soprattutto di quelli dolci, è indispensabile per valutare l'efficacia delle tecniche di stabilizzazione chimico-fisica adottate. Considerata la bassissima o nulla presenza di cellule questo tipo di controllo viene effettuato mediante filtrazione dell'intera bottiglia su una membrana polimerica piana, che viene poi adagiata su un substrato culturale specifico in ambiente sterile.

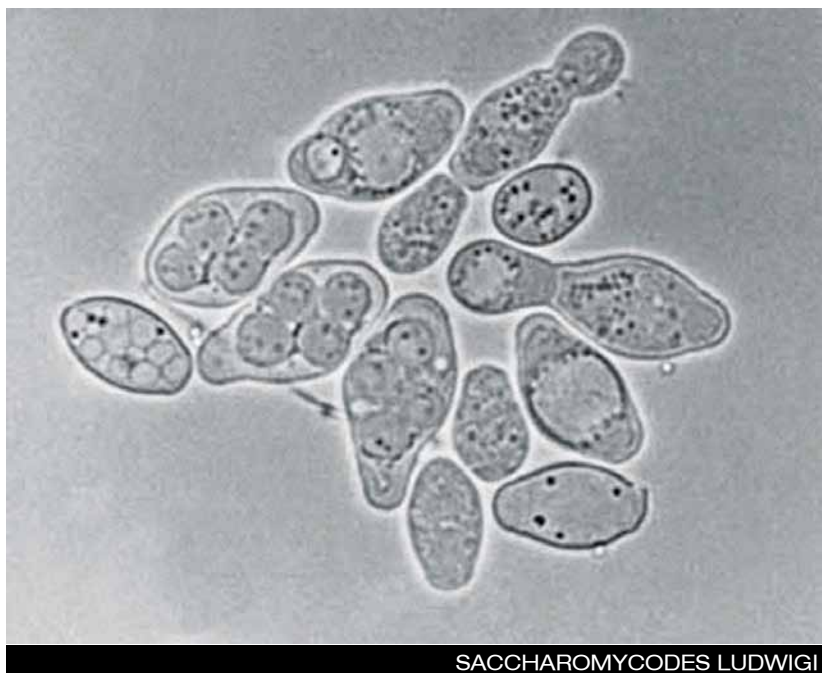
Il principale genere di lievito di interesse enologico è sicuramente *Saccharomyces*, che presenta cellule da rotonde a ovali più o meno allungate. E' il lievito più importante durante la fermentazione alcolica e le specie coinvolte nella produzione di vino sono *S.cerevisiae* e *S.bayanus*.

I sostenitori della vinificazione con fermentazione spontanea attribuiscono ai prodotti ottenuti per tale via una forte distinzione stilistica e "territoriale", rispetto ai prodotti ottenuti mediante l'inoculo di ceppi selezionati.

La maggioranza dei vinificatori tuttavia concorda sull'opportunità di non abbandonare i mosti al loro destino, ma di guidare la fermentazione cercando di favorire la prevalenza di i lieviti buoni fermentatori della specie *S. cerevisiae*. Anche i sostenitori della fermentazione spontanea curano la preparazione di pied de cuve spontanei che favoriscano l'avvio e il completamento della fermentazione alcolica.

Molti produttori ritengono invece più razionale ricorrere ai lieviti selezionati allestiti in forma secca attiva, ormai disponibili in una vasta gamma di selezioni varietali, ecotipiche e locali.

Nei mosti in fermentazione si possono individuare lieviti della specie *Candida stellata*, tipicamente presente su uve contaminate da *Botrytis*. Presenta cellule molto piccole e riunite in aggregati a forma di stella. Recentemente è stato scoperto che i lieviti di mosti ottenuti da uve botritiz-



SACCHAROMYCODES LUDWIGI

zate possono appartenere anche alla specie *Candida zemplinina*, una specie nuova con caratteristiche fisiologiche molto simili a quelle di *C. stellata*. Solo l'utilizzo di metodi molecolari può rendere evidente la differenza tra le due specie. La presenza di questi lieviti nei mosti può essere d'aiuto alleviando lo stress osmotico a cui *S. cerevisiae* deve resistere nella fermentazione di mosti particolarmente zuccherini, che può essere la causa di una maggior produzione di acido acetico. Questo è ad esempio il caso dei vini passiti. *C. zemplinina* è infatti in grado di utilizzare prevalentemente il fruttosio come fonte di carbonio, lasciando inalterato il glucosio per il nutrimento di *S. cerevisiae*. Altre peculiarità dei lieviti di questa specie sono la capacità di crescere a basse temperature ed una buona resistenza all'alcool.

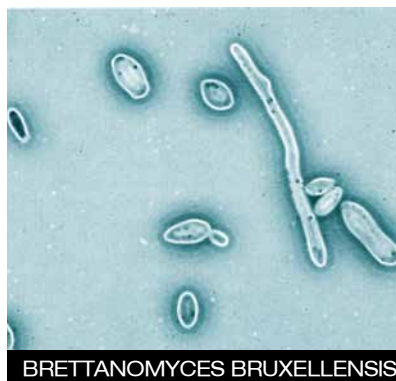
Il lievito *Saccharomyces ludwigii*, con grosse cellule apiculate a forma di "suola di scarpa", può essere facilmente individuato tramite osservazione al microscopio. Questo lievito è anche definito l'incubo del cantiniere, a causa della produzione, durante la fermentazione, di elevate quantità di acetaldeide, acetato di etile ed altri esteri, capaci di alterare irrimediabilmente le caratteristiche organolettiche del vino. Inoltre, la resistenza di questo lievito ad altissime concentrazioni di anidride solforosa, unita all'elevato potere alcoligeno, rende ancor più problematico il contenimento di questa specie.

Cellule con forma apiculata e di piccole dimensioni sono tipiche del genere *Hanseniaspora* (forma telomorfa *Kloeckera*). Le caratteristiche enologiche di questi lieviti sono associate alla loro presenza negli stadi precoci della fermentazione, la quale spesso inizia proprio ad opera di questi lieviti, caratterizzati da un basso potere alcoligeno (non oltre 3-6 gradi alcolici), scarsa resistenza all'anidride solforosa, elevata attività proteolitica e -glicosidasi.

Alcuni lieviti possono essere identificati in base alla loro modalità di moltiplicazione: la scissione è una modalità esclusiva del genere *Schizosaccharomyces*, le cui cellule possono essere identificate grazie alla presenza

di un setto centrale. In particolare, la specie di maggiore interesse enologico è *S. pombe*, che presenta peculiari caratteristiche enologiche: alto potere alcoligeno, fino a 15 gradi alcolici; capacità di crescere in presenza di elevate concentrazioni zuccherine, fino al 60% (p/V); elevata resistenza all'anidride solforosa, oltre 400 mg/L di SO₂, ed è responsabile della fermentazione malo-alcolica.

La presenza di uno pseudo micelio, costituito da cellule in catene variamente ramificate, può essere riconducibile alla presenza di specie appartenenti ai generi *Pichia* e *Candida*, agenti responsabili della caratteristica fioretta. Il genere *Pichia* è assai ampio e comprende circa 91 specie, molte delle quali si possono ritrovare in ambiente enologico. Le cel-



BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS

lule possono essere sferoidali, ellittiche o allungate, ma alcune possono appunto formare un pseudo micelio ramificato che ne facilita l'individuazione. Lieviti di questo genere hanno una scarsa capacità di fermentare gli zuccheri, un'elevata alcool tolleranza, alta resistenza all'anidride solforosa, in grado di formare pellicole, responsabili perciò della fioretta del vino; in presenza di ossigeno possono ossidare etanolo, glicerina e acidi non volatili, rovinando le caratteristiche sensoriali dei vini. Per fortuna non sopportano tenori in alcol superiori al 12,5%.

Mosti concentrati o particolarmente zuccherini possono essere facilmente colonizzati da lieviti del genere *Zygosaccharomyces*, riconoscibili al microscopio in quanto capaci di formare caratteristici aggregati cellulari. I lieviti del genere *Metschnikovia*, riscontrabili nei primi momenti della fermentazione, possono invece esse-

re riconosciuti per la presenza di un grosso vacuolo sferico, grande quasi come tutta la cellula.

Un ultimo lievito da trattare, di grande attualità, appartiene al genere *Brettanomyces*, ed è conosciuto per la capacità di produrre odori sgradevoli nel vino, fonte di notevoli deprezzamenti del prodotto finito. Si stimano infatti danni per milioni di dollari in tutto il mondo causati da contaminazioni dovute alla presenza di *Brettanomyces*. In particolare la specie *B. bruxellensis* è molto resistente, in grado di sopportare la mancanza di nutrienti e le alte concentrazioni di etanolo. Inoltre è capace di produrre elevate concentrazioni di acido acetico, ma soprattutto di convertire gli acidi idrossicinnamici, naturalmente presenti in mosti e uve, in fenoli volatili, tra cui 4-etil guaiacolo, 4-etilfenolo, 4-vinilguaiacolo ed 4-vinilfenolo. I difetti organolettici causati da *Brettanomyces spp.*, ormai riscontrati in vini di tutto il mondo, sono riconducibili a note olfattive associate a cane bagnato, orina di topo, sudore di cavallo, stalla, vernice, plastica, che vengono nell'insieme definiti nota "Brett". E' difficile eseguire un'accurata e precisa identificazione di lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces* tramite semplice esame visivo al microscopio, in quanto l'elevato grado di polimorfismo di questi microrganismi rende molto complicato il loro riconoscimento. Inoltre, a causa della crescita molto lenta, è spesso difficile isolare questi lieviti anche a partire da vini fortemente contaminati. Per tali ragioni, si stanno rapidamente diffondendo analisi di biologia molecolare basate sull'analisi del DNA e sulla sua quantificazione attraverso screening rapidi ed altamente affidabili (saggi PCR), che garantiscono l'identificazione sicura di *Brettanomyces*, anche in presenza di numeri limitati di cellule, quando le sostanze responsabili del danno olfattivo non si sono ancora formate.

¹ Simona Campolongo, Grape - Gruppo Ricerche Avanzate Per l'Enologia

² Vincenzo Gerbi, Luca Coccolin - Dip. Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA) - Università degli Studi di Torino