

MICROBIOLOGIA

Vittorio Capozzi^a

Mariagiovanna Fragasso^b, Franco Biasioli^c

^aISPA-CNR Foggia

^bDAFNE, Università di Foggia, ^cFondazione Edmund Mach
Gruppo di Microbiologia della Vite e del Vino



Nuovi approcci analitici per le combinazioni di lievito

La gestione della fermentazione alcolica (FA) in vinificazione è fondamentale per l'ottenimento del prodotto finito e, al contempo, rappresenta una delle fasi cruciali in termini di contributo alla sua qualità.

Come è ben noto, protagonisti del processo fermentativo sono i lieviti, generalmente divisi, per il loro significato ecologico e fermentativo, in due principali classi, non-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* spp.

Mentre i saccaromiceti sono indubbiamente i protagonisti della fermentazione alcolica, in quanto ceppi selezionati si distinguono per performance fermentative, resistenza agli stress caratteristici della filiera enologica e attitudine a migliorare la qualità delle produzioni vinicole, i non-*Saccharomyces* rappresentano una categoria eterogenea sia sotto il profilo tassonomico che per attitudine enologica, fornendo un serbatoio di soluzioni biotecnologiche utili, quando impiegati in combinazione ai *Saccharomyces*, a risolvere specifiche problematiche e/o a migliorare la diversificazione in termini di qualità sensoriale.

In effetti, le intense attività di ricerca applicata condotte in tutto il mondo hanno portato a numerosi ceppi

di non-*Saccharomyces* selezionati come potenziali colture starter, in diversi casi anche commercializzati da aziende specializzate del settore (Figura 1).

Le variabili microbiologiche in grado di influenzare gli esiti della fermentazione alcolica, in questo modo, crescono in numero (ad es. diverse combinazioni di lievito, diverse concentrazioni di inoculo, diverse tempistiche di inoculo), aggiungendosi a quelle legate a tipologia e qualità dell'uva (ad es. vitigno, maturità delle uve, sanità delle uve) e a quelle peculiari del regime di tecnologie applicate (ad esempio temperatura di fermentazione, eventuale pre-fermentazione a freddo, impiego di enzimi).

Il fatto, poi, che queste variabili siano spesso interdipendenti, con un alto grado di interazione, porta a un enorme "spazio enologico" associato alla FA che scienziati ed enologi contribuiscono a esplorare per ottenere standard di qualità elevati del prodotto finito e promuovere le dinamiche di innovazione.

Questa sfida spiega l'elevato interesse per approcci analitici innovativi utili a monitorare questo bioprocesso in tempi rapidi, economici e senza necessità di

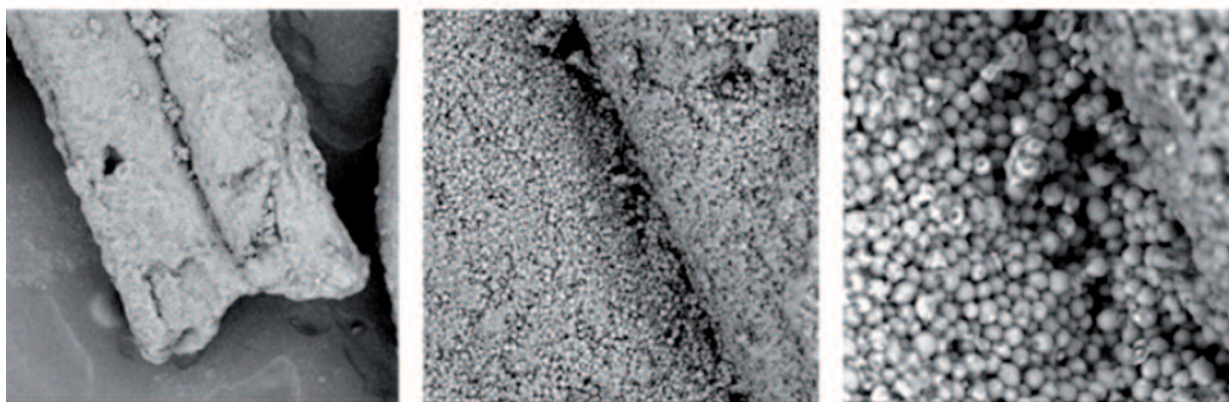


Figura 1 - Immagini al microscopio elettronico a scansione (ingrandimenti di circa 250X, 1500X, 5000X dello stesso campione, procedendo da sinistra verso destra) della superficie di lievito secco attivo (preparato commerciale di origine enologica).
Immagine modificata da Capozzi et al. <https://doi.org/10.3390/molecules21040483> (riprodotta con permesso).

fasi di estrazione e distruzione del campione. Da questo punto di vista, metodiche che hanno il target di analisi nei composti organici volatili (COV), presentano il vantaggio di monitorare una classe di molecole che al tempo stesso sono metaboliti del lievito (controllo continuo del bioprocesso) e composti di interesse per una valutazione delle basi molecolari associate alla qualità sensoriale del prodotto (valutazione dell'impatto organolettico).

Le tecnologie DIMS (*Direct-Injection Mass Spectrometric technologies*) rappresentano una classe di approcci strumentali analitici che offrono una notevole risoluzione, con elevata sensibilità e robustezza, consentendo la rapida rilevazione e quantificazione dei COV. Questi approcci strumentali includono, tra gli altri, *MS-e-noses*, *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry* (APCI-MS), *Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry* (PTR-MS), e *Selected Ion-Flow-Tube Mass Spectrometry* (SIFT-MS).

Di recente, in uno studio esplorativo, abbiamo valutato il potenziale delle DIMS nel monitoraggio della fermentazione alcolica, allo scopo di valutare l'impatto

di diverse variabili su questo bioprocesso di elevato interesse in enologia.

Tra le possibili strumentazioni analitiche, abbiamo utilizzato il PTR accoppiato alla spettrometria di massa a tempo di volo (PTR-TOF-MS), un approccio consolidato per il monitoraggio online rapido, diretto e non invasivo dei COV, caratterizzato da tempi di risposta brevi e alta sensibilità.

L'indagine ha esplorato l'effetto dell'inoculo di combinazioni multiple di due ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* e due ceppi non-*Saccharomyces* (afferenti alle specie *Metschnikowia pulcherrima* e *Torulasporea delbrueckii*, rispettivamente) sul contenuto di COV nel vino, sia in succo d'uva commerciale, sia in mosto d'uva.

In Figura 2 è possibile osservare una rappresentazione grafica del piano sperimentale realizzato e apprezzare, al contempo, un'esplorazione dei dati attraverso un'analisi delle componenti principali (PCA). Le prime due componenti spiegano l'84% della variabilità totale osservata e i profili forniscono una misura dell'evoluzione nel tempo di ogni singola prova,

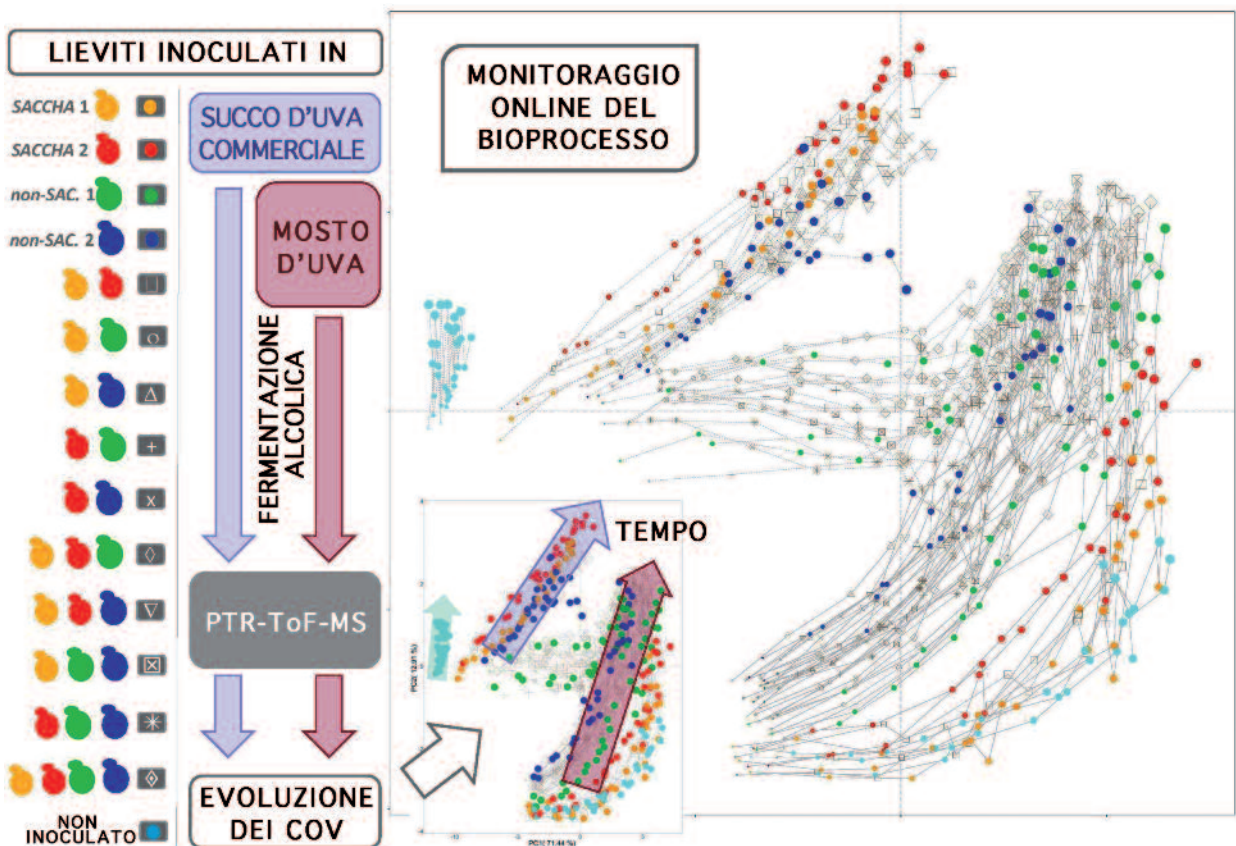


Figura 2 - Esempificazione del piano sperimentale (a destra) e rappresentazione grafica dell'analisi delle componenti principali funzionale a descrivere l'evoluzione del rilascio di composti organici volatili durante i primi tre giorni di FA (a sinistra).

Immagine modificata da Berbegal et al. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020055> (riprodotta con permesso).

in termini di analisi quali-quantitativa dei COV associati allo spazio di testa del campione.

Differenze nella distribuzione delle varianze sono rilevabili confrontando le matrici ‘mosto d’uva’ e ‘succo d’uva’, ma anche per quanto riguarda i singoli lieviti o le combinazioni di lieviti. È possibile seguire la scansione temporale del monitoraggio online osservando le dimensioni crescenti dei simboli in Figura 2.

Per le masse rilevate è possibile operare un’identificazione tentativa e seguire un profilo che restituisce informazioni sull’evoluzione della misurazione (Figura 3).

I risultati hanno dimostrato il potenziale del PTR-ToF-MS per il monitoraggio non invasivo della fermentazione alcolica, impiegando i composti organici volatili come biomarcatori e come molecole di interesse per valutare l’impatto dei diversi regimi di gestione dei microrganismi sulle proprietà organolettiche del prodotto finito.

L’approccio testato propone le *DIMS technologies* per il design di strategie innovative utili nello screening dell’impatto delle diverse variabili in grado di influenzare la FA in vino, con particolare riferimento all’impiego di colture starter singole e miste.

I risultati preliminari riportati hanno i) evidenziato la presenza di comportamenti diversi a seguito dell’inoculo delle diverse combinazioni di lievito in succo d’uva e in mosto e ii) confermato la presenza di differenze nei “volatomi” relativi all’inoculo dei singoli ceppi di lievito.

Si è trattato, peraltro, di uno dei primi studi a prevedere l’inoculo simultaneo di due specie di non-*Saccharomyces* insieme a un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*, valutando l’impatto in termini di contributo di COV.

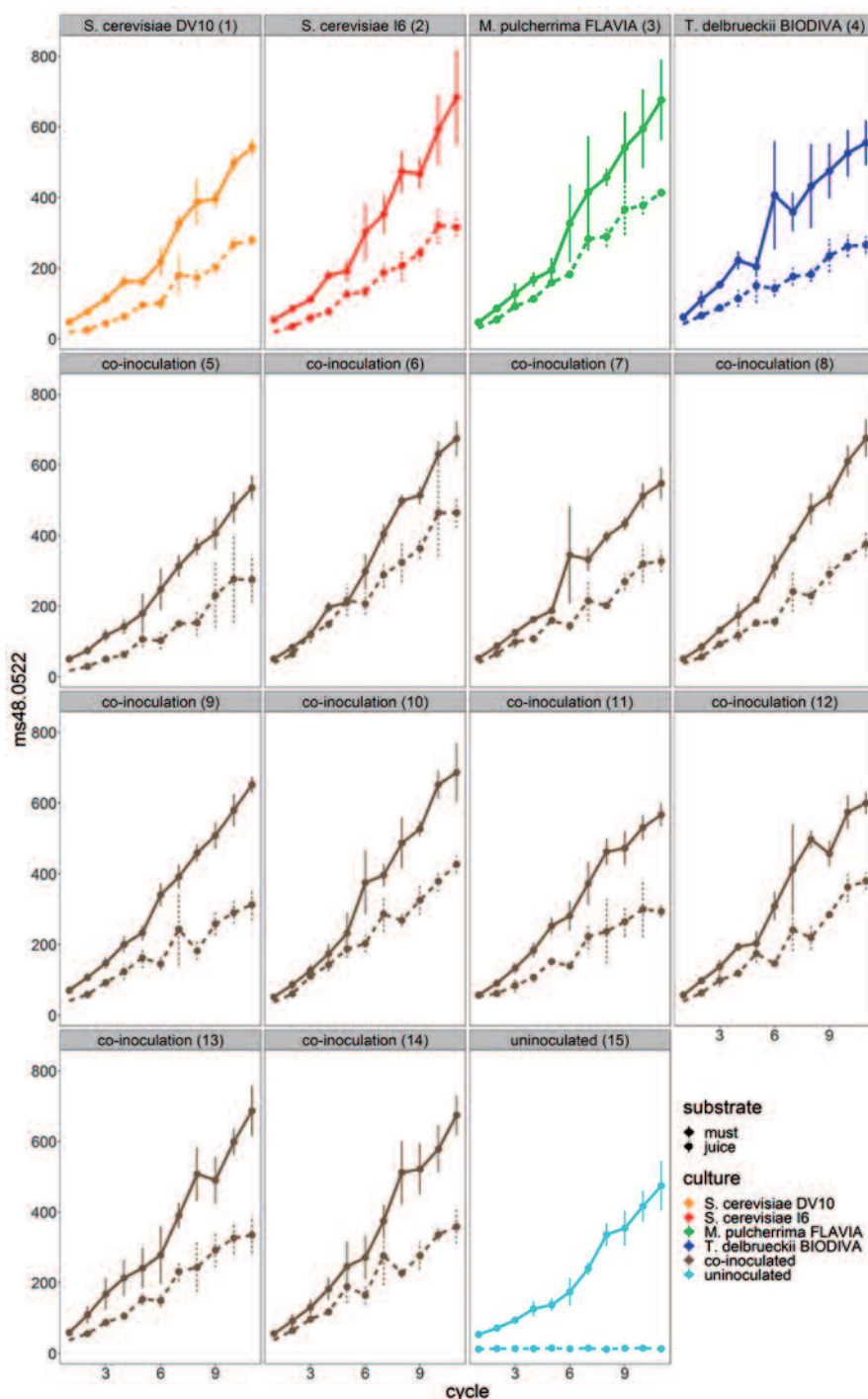


Figura 3 - Evoluzione del segnale relativo ad una specifica massa, associata ai primi tre giorni di FA, rappresentata separatamente per ciascuna prova. Le linee continue indicano il mosto d’uva, mentre quelle tratteggiate il succo d’uva. Immagine riprodotta con permesso da Berbegal et al. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020055>.