LAFFORT
l'œnologie par nature
Italia

La BIOPROTEZIONE

Le possibilità offerte dai progressi delle biotecnologie per la gestione integrata dell'ecosistema enologico, il potenziamento dell'espressione organolettica e la diminuzione dei livelli di SO_2 nei vini

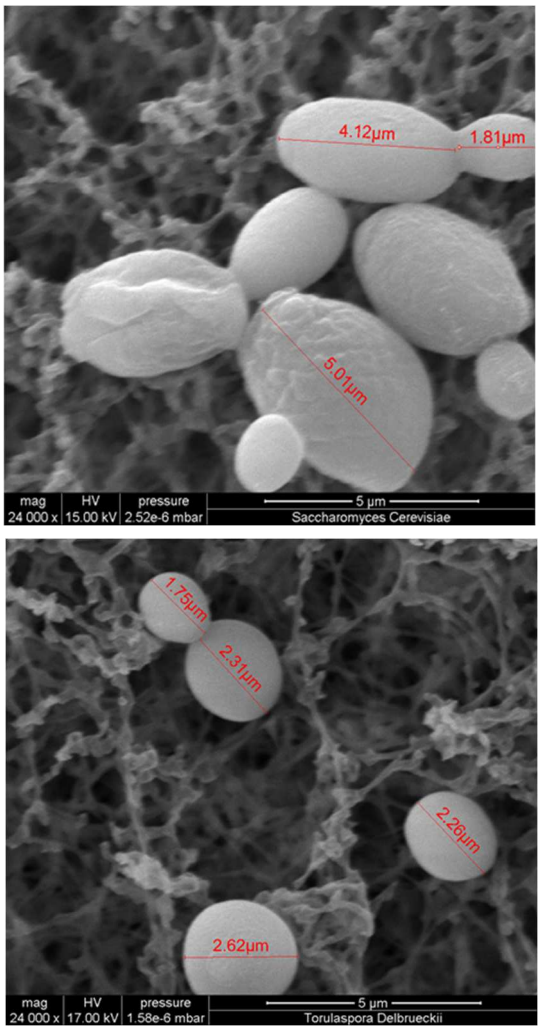


Figura 1 - Due dei protagonisti, dall'alto verso il basso: *S. cerevisiae; T. delbrueckii. Microscopio elettronico a rifrazione, ingrandimento X 24000* ***Bordeaux Imaging Center - Pôle d'Imagerie Electronique - Université Bordeaux 2***

Fino a non molti anni or sono...

tutto ciò che in enologia, a livello microbiologico, non apparteneva alle specie *Saccharomyces cerevisiae* od *Oenococcus oeni* era guardato con estremo sospetto se non con aperta ostilità e tenuto a bada da generosissime dosi di anidride solforosa il cui utilizzo, nell'immediato dell'ammostamento, era finalizzato *"ad operare una efficace e radicale selezione massale sui "**lieviti selvaggi**" notoriamente di gran lunga più sensibili all'additivo rispetto ai "**domestici**" Saccharomyces".*

Da quei tempi - neppur troppo lontani, a dire il vero - molta strada è stata percorsa e moltissimo vino è stato prodotto, e intanto si è iniziato pian piano a riferirsi ai *non-Saccharomyces* (NS, brevemente) con l'appellativo di lievito "**indigeno**", segno che qualcosa, almeno nell'ambito della ricerca, stava iniziando a cambiare.

Vero è che le sgradevoli sorprese sovente combinate dai numerosi microrganismi appartenenti ai vituperati generi "***selvaggi***" non appena si alleggeriva il pugno di ferro della SO_2 non erano né poche e neppure lievi, e nessun tecnico è mai stato disposto a perdonare facilmente qualsiasi cosa attenti alla qualità dei "suoi" prodotti. La loro radicata ostilità e diffidenza era - ed è per molti versi tutt'ora - ampiamente giustificata, ma anche - come sovente purtroppo accade - legata soprattutto ad una scarsa conoscenza.

Per essere in grado di comprendere a pieno tutta l'importanza e la complessità delle acquisizioni in gioco può essere interessante ripercorrerne, anche se forzatamente per sommissimi capi, le principali tappe.

L'identificazione e la caratterizzazione dei ceppi di lievito

Con l'invenzione del microscopio ottico (definito da **Galileo Galilei** come "l'occhialino per vedere le cose minime") tra la fine del 1500 ed i primi del 1600 si è aperta per la Scienza la possibilità di indagare il mondo dell'invisibile ad occhio nudo.

Ma è interessante innanzitutto notare la distanza che separa il "vedere" le cose dalla comprensione esatta del loro ruolo: è solo dopo la metà del 1800 - quindi quasi 250 anni più tardi - che **Louis Pasteur** riconobbe il ruolo centrale di lieviti e batteri, identificati chiaramente quali esseri viventi, nella produzione (e nelle

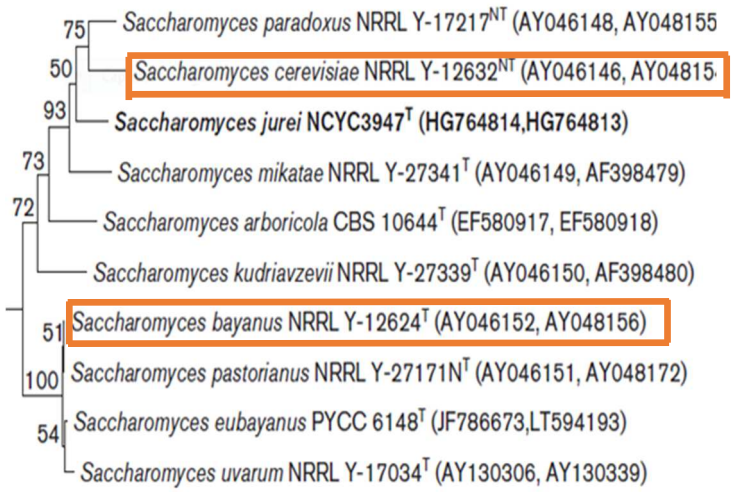


Figura 2 - Tassonomia del genere *Saccharomyces*, redatta secondo gli attuali criteri genetici. ***Saccharomyces cerevisiae*** e ***Saccharomyces bayanus*** costituiscono, secondo i moderni principi, due specie ben distinte e separate.

alterazioni) delle due principali bevande fermentate prodotte in Europa all'epoca - il vino e la birra.

Parallelamente ai progressi degli strumenti di indagine microscopica, dapprima ottici ed in seguito elettronici, fondamentali per l'avanzamento delle ricerche volte alla identificazione e caratterizzazione dei ceppi di lievito sono state le acquisizioni nei campi della biologia, della biochimica, della genetica e della metabolomica applicate alla tassonomia.

E se fino agli anni '50 del secolo scorso la tassonomia si basava fondamentalmente sull'osservazione dei caratteri **morfologici** (forma e colore delle cellule e delle colonie a seguito di osservazione microscopica) già attorno agli anni '70 il lavoro di classificazione era condotto sulla scorta dello studio di **caratteristiche metaboliche** (produzione/assimilazione o meno di determinati metaboliti/nutrienti) a partire dagli anni '90 iniziarono ad essere utilizzati criteri genetici, il che condusse, fra l'altro, ad una profonda revisione della tassonomia classica (vedi al proposito Fig. 2). E per questo fatto una menzione particolare, per la sua importanza nell'ambito delle indagini di identificazione e di controllo dei microrganismi e delle loro consociazioni, merita l'ideazione, il successivo sviluppo e la progressiva diffusione a costi via via più accessibili della tecnica di biologia molecolare nota come **PCR** (acronimo per *polymerase chain reaction* - reazione a catena della polimerasi).

Messa a punto da **Kary Banks Mullis**, che per questo fu insignito del Premio Nobel per la Chimica nel 1993 (riconoscimento condiviso con Michael Smith), la PCR - in estrema sintesi - consente l'**amplificazione** *in vitro* di frammenti anche minimi di acidi nucleici: permette così di ottenere rapidamente ed in maniera economica le quantità di materiale genetico necessarie per procedere alle successive indagini che si desiderano condurre.

E' la metodica, ad esempio, che viene normalmente utilizzata per ottenere il materiale necessario a determinare l'identità del ceppo di lievito che sta conducendo la fermentazione alcolica di una massa di vino, comunemente utilizzata nei controlli di fermentazione: proprio grazie alla PCR allo scopo sono sufficienti poche decine di mL di mosto, e partendo dalle cellule ivi contenute si è in grado di risalire con rapidità, per confronto con i profili presenti in banca dati, alla conferma o meno dell'identità del ceppo fermentante.

Da questo sinteticissimo *excursus* storico si evince come i progressi della conoscenza in ogni campo dello scibile umano siano strettamente legati alle acquisizioni alle quali si è pervenuti nelle epoche precedenti, ed all'utilizzo integrato e coordinato delle stesse: siamo veramente, per dirla con Bernardo di Chartres ed Isaac Newton, i "nani sulle spalle di giganti".

Negli ultimi vent'anni: i progressi delle tecniche analitiche e le acquisizioni sui non-*Saccharomyces*

Disponendo quindi dell'arsenale di conoscenze e tecniche or ora passato in rassegna è stato possibile dare il via, a partire dalla fine degli anni '90 del secolo scorso, ad uno studio sistematico e mirato sulle cinetiche e l'evoluzione delle popolazioni microbiche attive dalle primissime fasi dell'ammostamento fino all'inoculo con il fermentatore prescelto, e oltre. Come evidente, la possibilità di identificare in maniera rapida e precisa le differenti specie di lieviti nel corso del loro sviluppo ha consentito di conoscere aspetti fino al momento ignoti circa lo sviluppo della flora microbica nelle diverse fasi della lavorazione dei mosti.

Un'idea delle ricadute nella pratica enologica di queste acquisizioni possono essere schematizzate in Fig. 3.

Per quanti riguarda nello specifico ZYMAFLORE® ALPHA™ e ZYMAFLORE® EGIDE™ è possibile ritrovare le informazioni di base nei **Laffort Info n° 71 e 107**, rispettivamente.

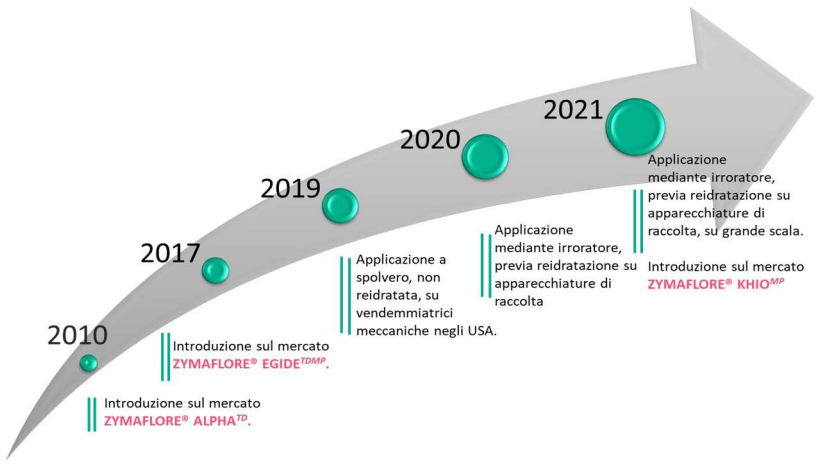
L'evoluzione e la diversificazione nell'utilizzo *enologico*

Come appare evidente ad una revisione in prospettiva storica del materiale scientifico e tecnico prodotto nel corso degli anni, dopo l'individuazione di ceppi NS il primo obiettivo della ricerca è stato quello di identificare, nel loro ambito, ceppi dotati di caratteristiche enologicamente interessanti, in grado di contribuire alla produzione enologica in condizioni ostiche per i *Saccharomyces cerevisiae* tradizionalmente utilizzati, e di sviluppare attività enzimatiche utili alla produzione di vini organoletticamente variegati e complessi.

Successivamente ci si è rivolti, con uno sguardo più ampio, al sistema mosto-vino considerato nella sua globalità, visto cioè come ecosistema.

Al ruolo quindi delle differenti popolazioni NS nel corso delle trasformazioni enologiche, in particolare nelle situazioni sempre più attualmente frequenti di ridotto o nullo tenore di anidride solforosa, anche nell'ottica di ottimizzare l'utilizzo e l'efficacia di detergenti e sanificanti.

L'applicazione di queste tecniche è da tempo praticata in numerosi settori dell'agroalimentare (vedi al riguardo in particolare il **Laffort Info n° 107)**, ma è degli inizi di quest'anno una interessantissima pubblicazione sul Journal of Agricultural and Food Chemistry, ad esempio, che ha riferito sugli importanti effetti del microbioma



Fgura 3: evoluzione della proposta non-*Saccharomyces* in gamma Laffort

naturale delle foglie sui caratteri qualitativi del Tè nero.

Com'è evidente dunque il progresso scientifico è continuo ed incessante, e le sue applicazioni pratiche si ampliano e si diversificano costantemente.

ZYMAFLORE® EGIDE^{TDMP} *le prove condotte su attrezzature di raccolta*

Nel corso di prove effettuate nelle ultime tre trascorse campagne agrarie, in entrambi gli emisferi, si è potuta constatare l'efficacia dell'applicazione di ZYMAFLORE® EGIDE^{TDMP} per spolvero senza reidratazione ed a spruzzo previa dispersione in acqua (50 g/L, conservabile a temperatura ambiente - max. 25 ° C - per 4 - 6 h.). Le classiche piastre Petri di controllo (Fig. 4) evidenziano l'efficacia repressiva del mix ***T. Delbrueckii - M. pulcherrima*** sullo sviluppo delle colonie di muffe e batteri sulle superfici trattate che possono andare dalle vendemmiatrici meccaniche (teste di raccolta, trasportatori, convogliatori, benne) ai rimorchi di trasporto dell'uva raccolta, alle attrezzature di ricevimento e cernita delle uve, fino, nel caso della raccolta manuale, all'applicazione nel trattamento dell'acqua nei sistemi automatizzati a spruzzo per la pulizia delle cassette per uva.

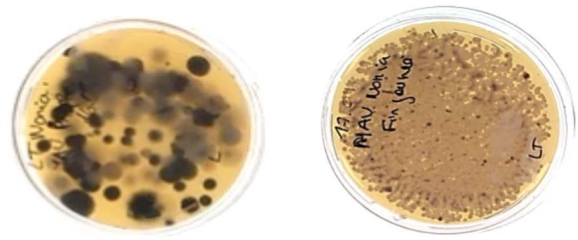


Figura 4 - Piastre Petri di controllo — Applicazione di bioprotezione con Zymaflore Egide. **A sinistra testimone non trattato (presenza di colonie di muffe) a destra si riconosce il caratteristico mix di colonie *T. Delbrueckii - M. pulcherrima***

Ulteriori progressi nelle metodiche analitiche: le conferme ed i progressi.

L'evoluzione delle tecniche e delle strumentazioni analitiche stanno permettendo di condurre determinazioni a livelli estremamente raffinati circa le dinamiche delle popolazioni dei lieviti utilizzati in bioprotezione e dei microrganismi di contaminazione in situazioni molto specifiche, quali ad esempio le masse d'uva raccolta in assenza di anidride solforosa, nella valutazione comparativa dell'efficacia di differenti sistemi di bioprotezione.

Gli spettrometri di massa **MALDI-TOF** (acronimo per **Matrix- Assisted Laser Desorption/ Ionization - Time of Flight)** introdotti dapprima nell'ambito della diagnositica medica e successivamente della microbiologia applicata, consentono in maniera molto agile e rapida di ottenere in tempo reale ed "in contemporanea" gli "spettri" di identificazione dei differenti microrganismi presenti in un campione.

In Fig. 5 sono riportati i profili di abbondanza relativa dei geni del phylum *Ascomycota* in campioni di mosto in macerazione prefermentativa (all'inizio (Vatting) - dopo (24 h) - dopo (48 h) con riferimento a tre tesi sperimentali 0 = testimone - BP = BioProtezione - SO_2).

E' della massima evidenza come, sia nella tesi non trattata che in quella riferibile al trattamento con SO_2 i generi predominanti risultino essere *Aureobasidium*, *Cladosporium* e *Botriytis*; mentre *Torulaspora* e *Metschnikowia* risultano nettamente prevalenti dove utilizzati in bioprotezione senza aggiunta di anidride solforosa.

Questi risultati hanno consentito di confermare i risultati ottenuti nell'utilizzazione di specie di bioprotezione sul complesso microbico dei mosti in fase prefermentativa.

Comparata con il tradizionale utilizzo della SO_2 la bioprotezione ha evidenziato di essere in grado di promuovere

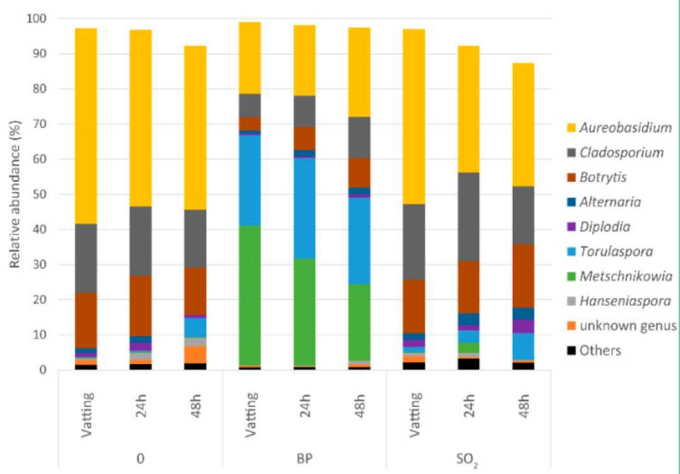


Figura 5 - Abbondanza relativa di generi di microrganismi rilevati tramite MALDI-TOF in campioni di mosto in fase prefermentativa in tre modalità (0 = testimone non trattato - BP = BioProtezione - SO_2) - Sara Windholtz *et al.* 2021

Fgura 6: differenze sul piano del colore evidenti su campioni di mosto da uve bianche (BP = trattamento mediante bioprotezione; 0 = testimone non trattato; SO_2).

una efficace occupazione della nicchia ecologica senza alterare qualitativamente l'originaria biodiversità; ma portando al decremento quantitativo di *Aureobasidium*, *Cladosporium* e *Botriytis* ed alla contemporanea drastica riduzione della presenza di *Hanseniaspora uvarum.*

Ripensando poi nel dettaglio alle conseguenze dell'utilizzo dell'anidride solforosa sui mosti appare pertanto chiaro come, **sotto il profilo microbiologico**, la pressione selettiva dei microrganismi utilizzati per la bioprotezione costituisca un valido vicariante dell'azione antimicrobica dell'anidride solforosa. In più è necessario notare come, in effetti, la SO_2 non faccia, per così dire, "piazza pulita", il suo effetto dal punto di vista microbiologico è, più precisamente, quello di bloccare lo sviluppo delle popolazioni presenti (vedi sempre Fig. 5, pagina precedente: confrontando i diagrammi di abbondanza specifica relativi rispettivamente al testimone non trattato (0), al trattato con SO_2 ed al trattato con bioprotezione (BP) si può notare come l'insieme dei profili specifici relativi al testimone 0 ed al trattato con anidride solforosa siano in larga misura sovrapponibili, mentre da questi due si discosti in maniera molto netta invece la tesi BioProtetta).

Dal punto di vista della **protezione antiossidante** emergerebbe poi un certo ruolo della flora bioprotettiva (*Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*) nel favorire il consumo di ossigeno, in maniera addirittura superiore rispetto a quanto non avvenga con l'anidride solforosa, e nel promuovere, in una certa misura, il contenuto in glutatione ridotto dei mosti trattati.

Gli effetti, sotto l'aspetto visivo, sono già ad un primissimo macroscopico approccio molto evidenti (vedi Fig. 6, qui in alto), resta da approfondire precisamente il ruolo della biomassa protettiva nella cinetica del consumo di ossigeno, ed anche nei confronti della presenza di glutatione: se cioè lo assumano dal mosto e lo rilascino in occasione della lisi successiva alla loro morte, oppure se siano in grado di operare una sintesi attiva del tripeptide.

I risultati delle prove, valutati inoltre a più riprese sotto **il profilo degustativo** da panel addestrati, hanno inoltre messo in evidenza nelle tesi bioprotette, soprattutto per i vini rossi, una maggiore freschezza ed espressività rispetto alle tesi solfitate, senza presentare quella certa durezza legata a volte all'utilizzo dell'anidride solforosa, o le scompostezze organolettiche sovente evidenti nelle prove non trattate.
Più in particolare sui bianchi è stato netto l'importante impatto della bioprotezione nella salvaguardia della freschezza, con qualche limitazione sull'intensità del carattere aromatico delle varietà tioliche rispetto alle tesi solfitate.

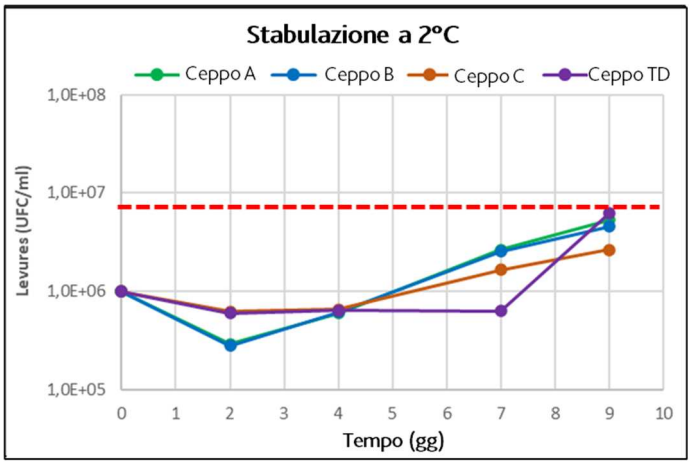
Risultati, tutti questi, di estremo interesse, che aprono spunti interessanti per il prosieguo delle indagini in particolare verso i settori della vinificazione in bianco e delle vendemmie tardive e che confermano nuovamente, ma con maggior dettaglio e prospettiva quanto già acquisito con le metodiche prima descritte, basate su tecniche di ricerca di meno recente concezione ma maggiormente collaudate e di più tradizionale applicazione nel settore enologico.

Strumenti innovativi per nuove tecniche enologiche

In alcune zone di produzione (segnatamente in Provenza su alcune specifiche tipologie di prodotto, quali i rosati - vedi in particolare il Laffort Info n° 119) sono diffuse da tempo particolari metodiche produttive, come ad esempio la **Stabulazione liquida a freddo**, che trovavano corretta ed agevole applicazione anche grazie all'utilizzo di dosi do SO_2 oggi non più sempre tollerate. Ecco che allora si impone la necessità di trovare soluzioni di Bioprotezione innovative pensate *ad hoc.*

La *Metschnikowia pulcherrima* è già conosciuta in ambito Laffort per essere una delle specie componenti la consociazione bioprotettiva ZYMAFLORE® EGIDE™. Un **nuovo ceppo** di *M. pulcherrima* è stato isolato e selezionato in quanto adatto alle estreme condizioni di temperatura legata alla particolare variante tecnologica adottata.

Sua caratteristica specifica è la **capacità di moltiplicarsi e colonizzare il substrato in maniera rapida ed efficace**, senza che, nelle condizioni psicrofile nelle quali si trova, venga avviata attività fermentativa. E' evidente come **in assoluto** nessun lievito possa essere definito NON **fermentativo**, ma dal diagramma sottostante appare evidente, come, nelle condizioni di temperatura e nei tempi appropriati, il ceppo selezionato (**curva in colore rosso**) presenti le caratteristiche ricercate.



ZYMAFLORE®
KHIO^MP
La BioProtezione specifica, per pigiati e mosti bianchi e rosati, nel corso delle fasi prefermentative alle basse temperature.