



Progetto eWINE

(Joint Project 2005)

Il concetto di tracciabilità applicato ad un processo di produzione di batteri selezionati per uso alimentare

Fabio Fracchetti

Dip. Biotecnologie
- Microbiologia Alimentare ed Enologica -
Laboratorio Prof.ssa Torriani

Esercitazione BioInformatica - 11 Maggio 2010

Indice della presentazione

1. Introduzione:

- fermentazione malolattica e starter commerciali
- metodi per la selezione di ceppi commerciali

2. Obiettivi e partnership del progetto eWINE

3. Schema del processo di produzione

4. Focus sulla prima parte:

- individuazione nella collezione del ceppo adatto
- inoculo in mezzo sintetico – due approcci
- verifiche sulla coltura in termostato: vitalità e purezza
- processo per il mantenimento della collezione
- 2 casi studio di tracciabilità con RFID

1. Introduzione: il processo di vinificazione

Vinificazione → trasformazione del mosto d'uva in vino

2 processi fermentativi guidati da microrganismi diversi:

A. Fermentazione alcolica (FA) ad opera dei **lieviti**

zuccheri del mosto → etanolo e CO_2

(aumenta la gradazione alcolica, si liberano aromi)

B. Fermentazione malolattica (FML) ad opera di **batteri lattici**

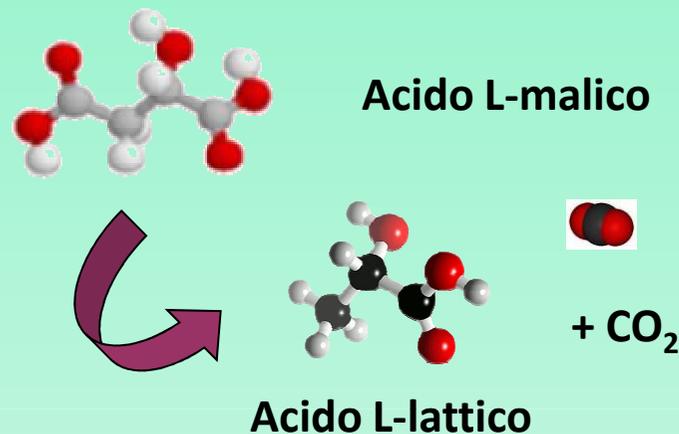
acido L-malico → acido L-lattico e CO_2

(diminuisce acidità, diminuisce astringenza, si liberano aromi, il vino è più stabile)

- alcuni vini (soprattutto bianchi giovani) sono imbottigliati senza FML, e sono stabilizzati chimicamente (solfiti)
- tradizionalmente prima FA e poi FML (fermentazioni sequenziali)
- in alcune occasioni FA e FML simultanee (co-inoculo)

1. Introduzione: la fermentazione malolattica (FML)

FML è quindi solo un passaggio del processo di vinificazione (ma per alcuni tipi di vino è fondamentale)



Una gestione corretta è importante per:

- gestione FML in tempi certi
- stabilità del vino (consumo sostanze fermentescibili)
- effetti desiderati su aromi e gusto
- sicurezza dei consumatori

Qualità

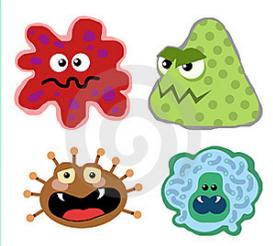
Gestione della FML



**uso di batteri selezionati
(starter malolattici)**

1. Introduzione: uso di microrganismi selezionati

? microrganismi selezionati per uso alimentare ?



Non sono pericolosi?



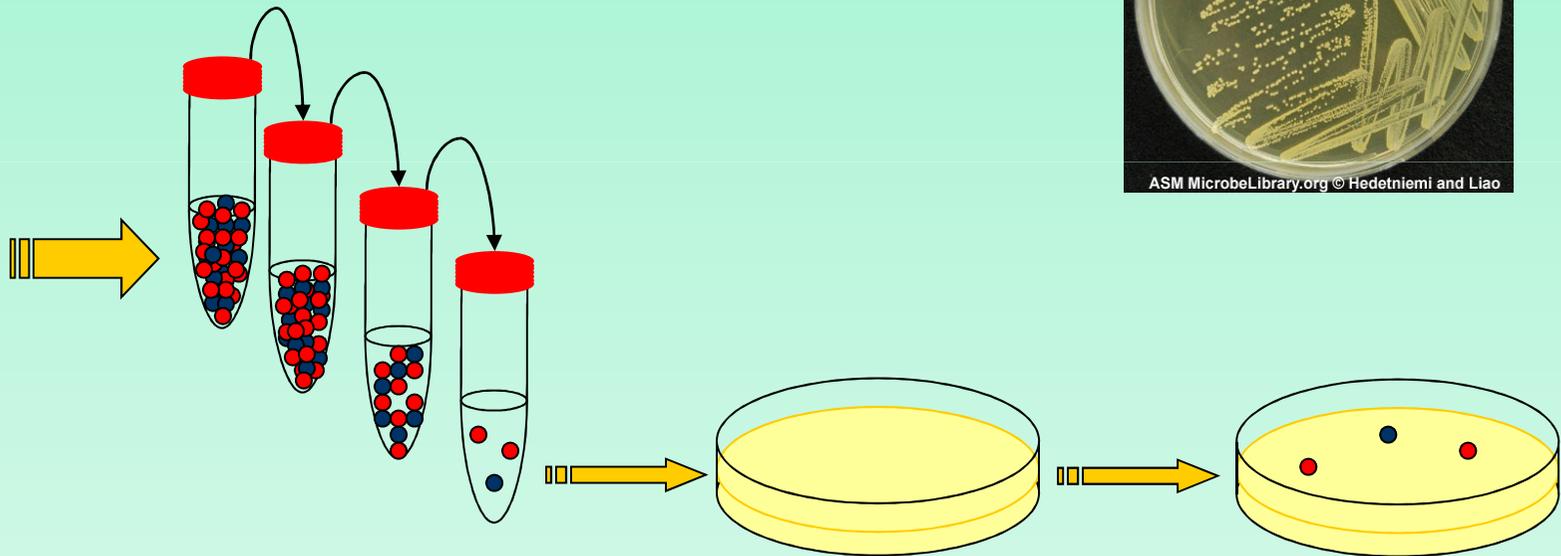
Alcuni microrganismi (batteri, lieviti, muffe) sono responsabili del processo di fermentazione e maturazione di alimenti molto comuni.



1. Introduzione: selezione dei ceppi batterici

Come si selezionano batteri per uso alimentare?

Isolamento → con metodi di microbiologia classica (diluizioni e purificazioni)



Ceppo: popolazione omogenea di cellule che condividono stesso patrimonio genetico (cloni)

1. Introduzione: selezione dei ceppi batterici

Identificazione → descrizione e assegnazione di un nome secondo regole tassonomia



es. *Oenococcus oeni*
(Dicks *et al.*, 1995)

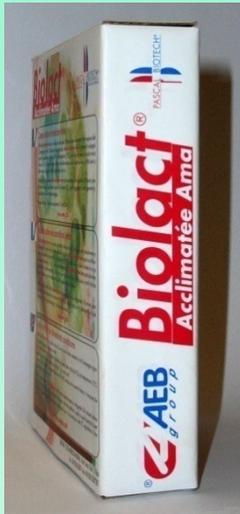
- forma coccica, coppie o catenelle
- acidofilo
- crescita al 10% v/v di etanolo
- ...

Caratterizzazione ceppo → differenze tra ceppi della stessa specie
→ si selezionano quelli con le migliori proprietà enologiche

es. un ceppo che sviluppa in presenza del 12% v/v di etanolo è preferibile rispetto ad uno che sviluppa in 10% v/v, pur appartenendo entrambi alla specie *O. oeni*

1. Introduzione: i batteri malolattici

Starter malolattici commerciali:



- singolo ceppo
- miscela di ceppi differenti

- freschi – colture liquide
- congelati
- liofilizzati

- diffusi in tutto il mondo
- prodotti e distribuiti localmente

Specie di batteri lattici a cui appartengono alcuni starter malolattici commerciali:

➤ *Oenococcus oeni*

➤ *Lactobacillus plantarum*

➤ *Lactobacillus hilgardii*

2. Progetto eWINE - Obiettivi

Contesto:

Processo di produzione di batteri malolattici in forma liofilizzata da usare per processi di vinificazione industriale.

Obiettivo 1:

individuare fasi di processo di produzione e sviluppare strumenti e protocolli basati su tecnologia RFID per tenere traccia del prodotto all'interno della filiera.

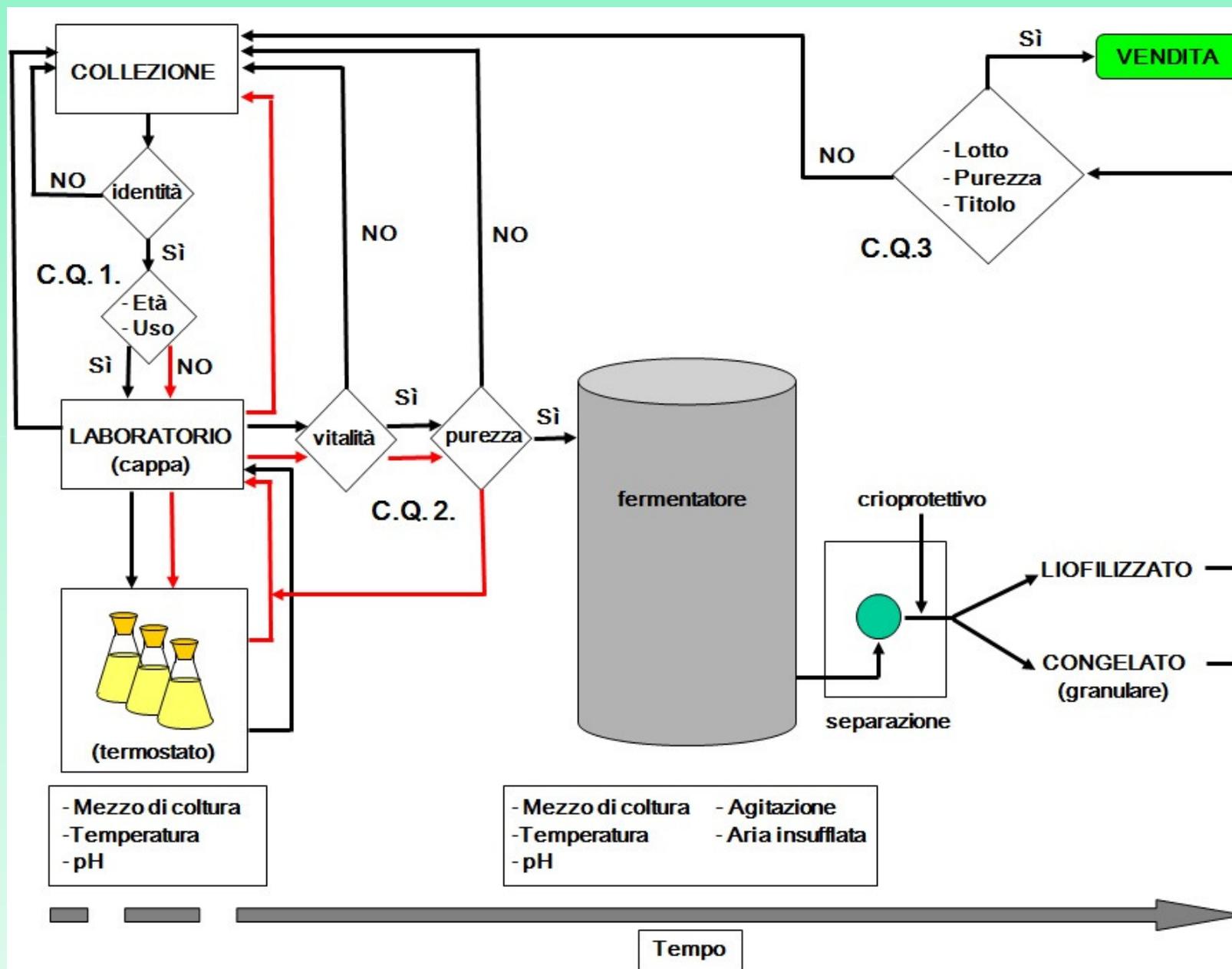
Obiettivo 2:

Integrare conoscenze e competenze diverse allo scopo di migliorare l'efficienza del processo e la qualità del prodotto

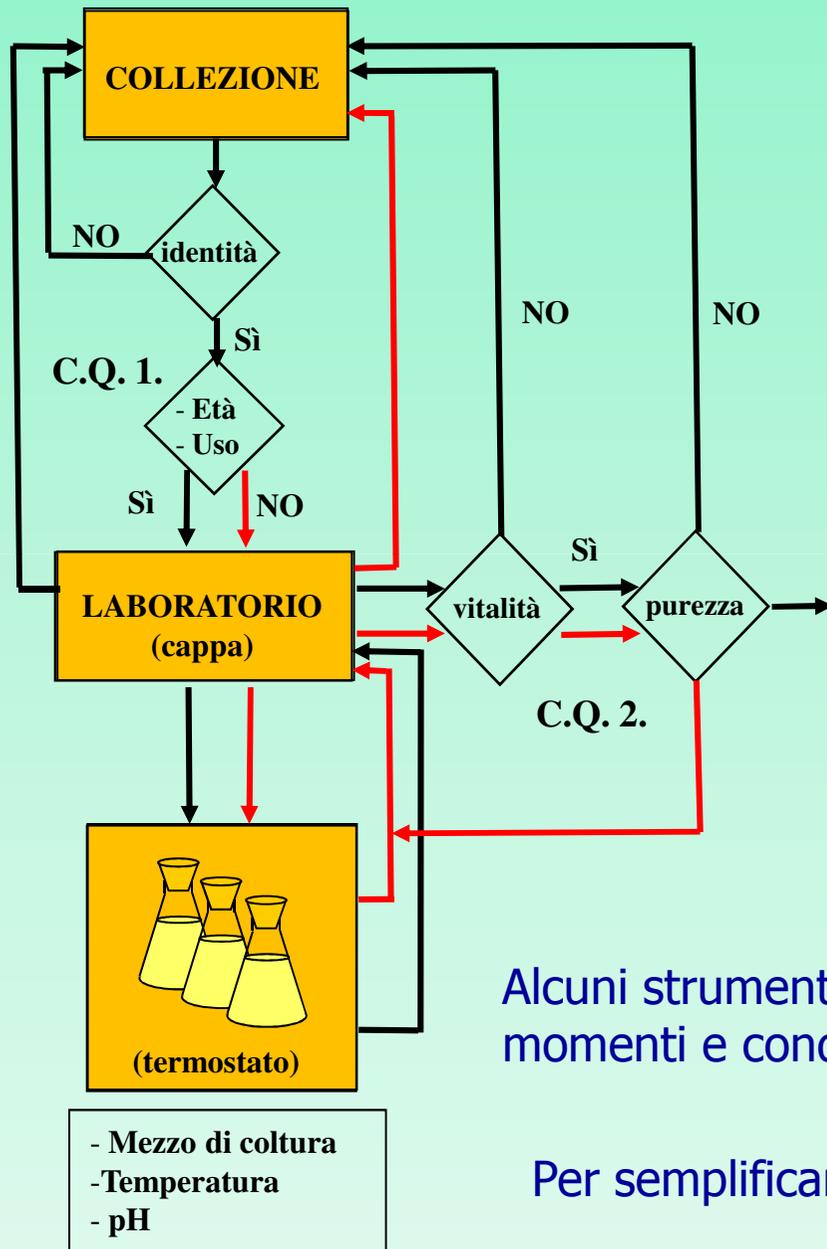
2. Progetto eWINE - partnership



3. Schema del processo di produzione



4. Focus sulle prime fasi del processo



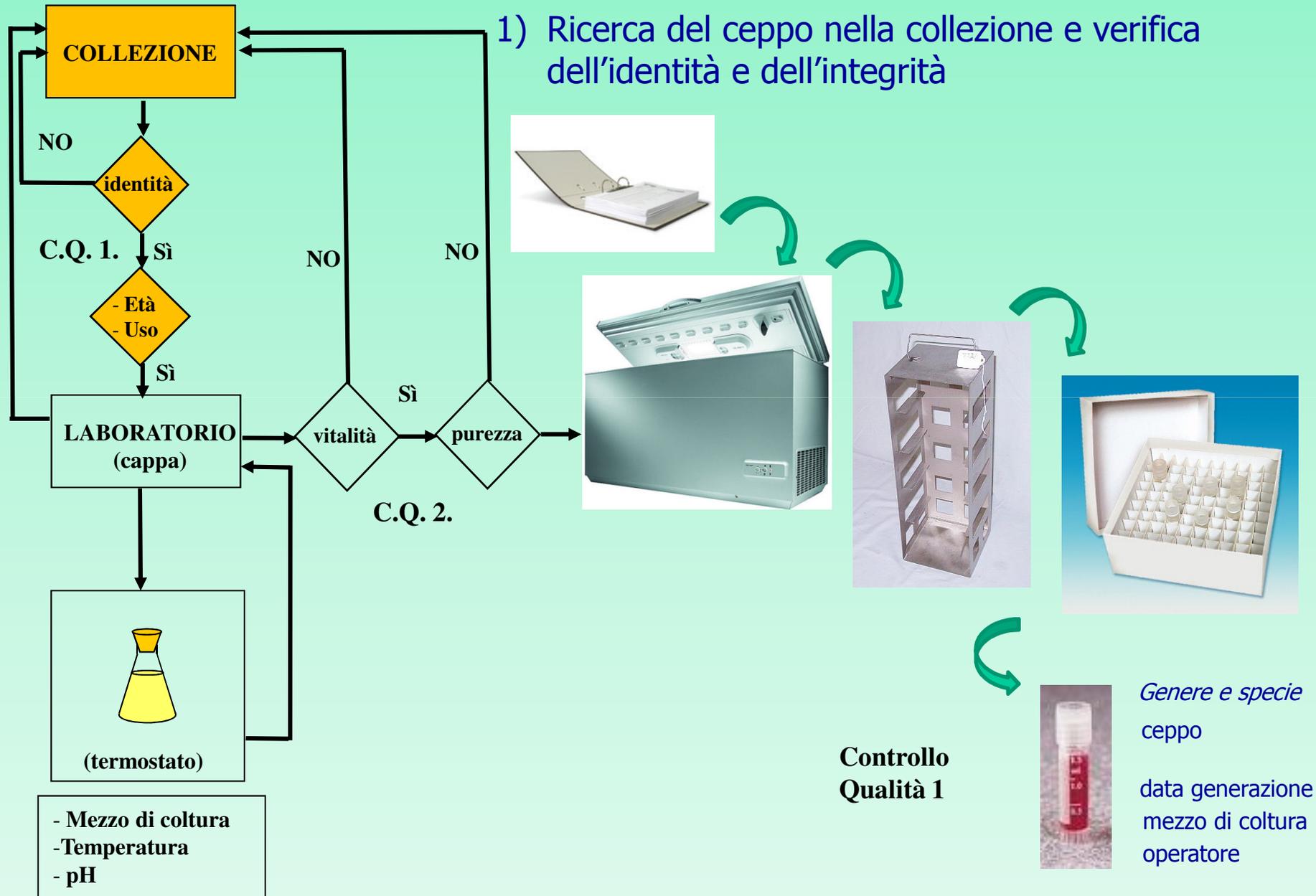
Analizziamo la prima parte del processo e individuiamo:

- i possibili problemi che pu  incontrare un operatore
- dove pu  intervenire un bioinformatico

Alcuni strumenti e/o spazi di lavoro sono utilizzati in diversi momenti e condizioni

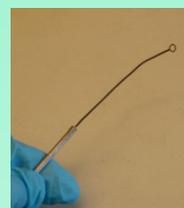
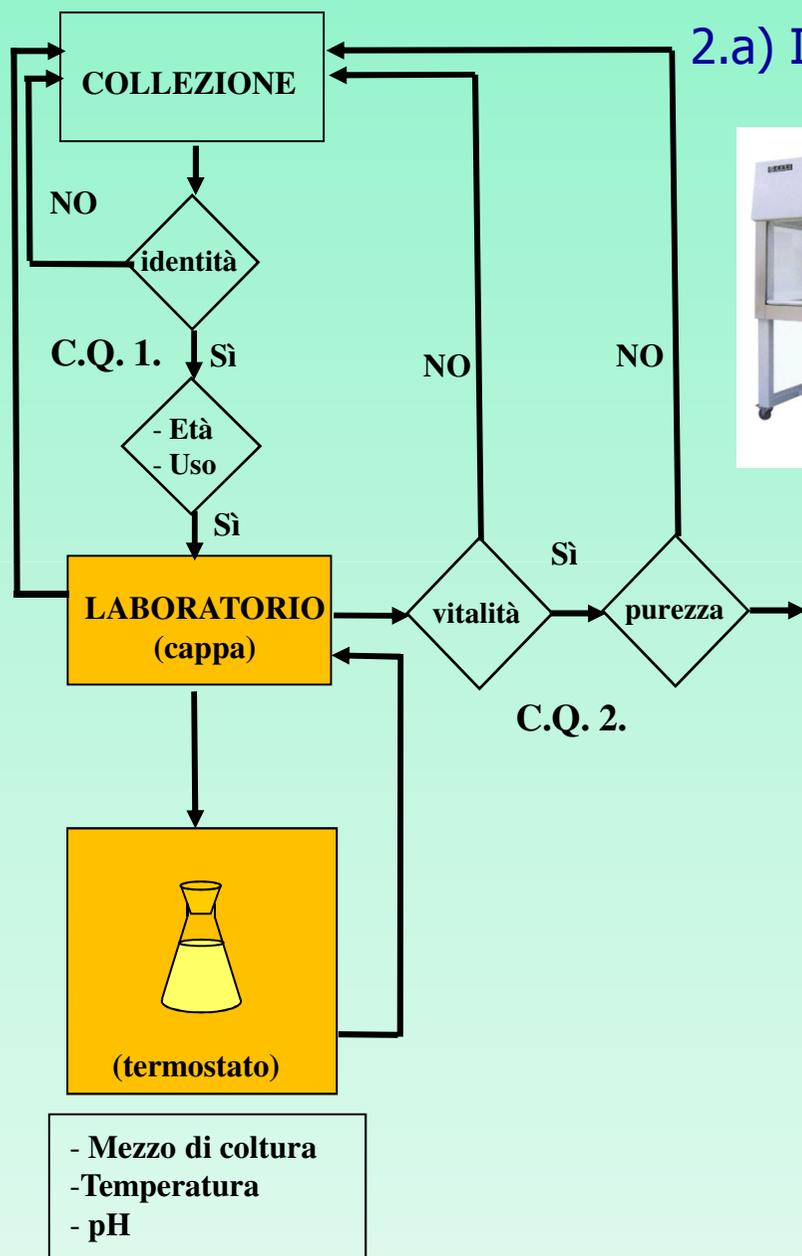
Per semplificare lo schema, vediamo prima un caso "base"

4. Focus sulle prime fasi del processo

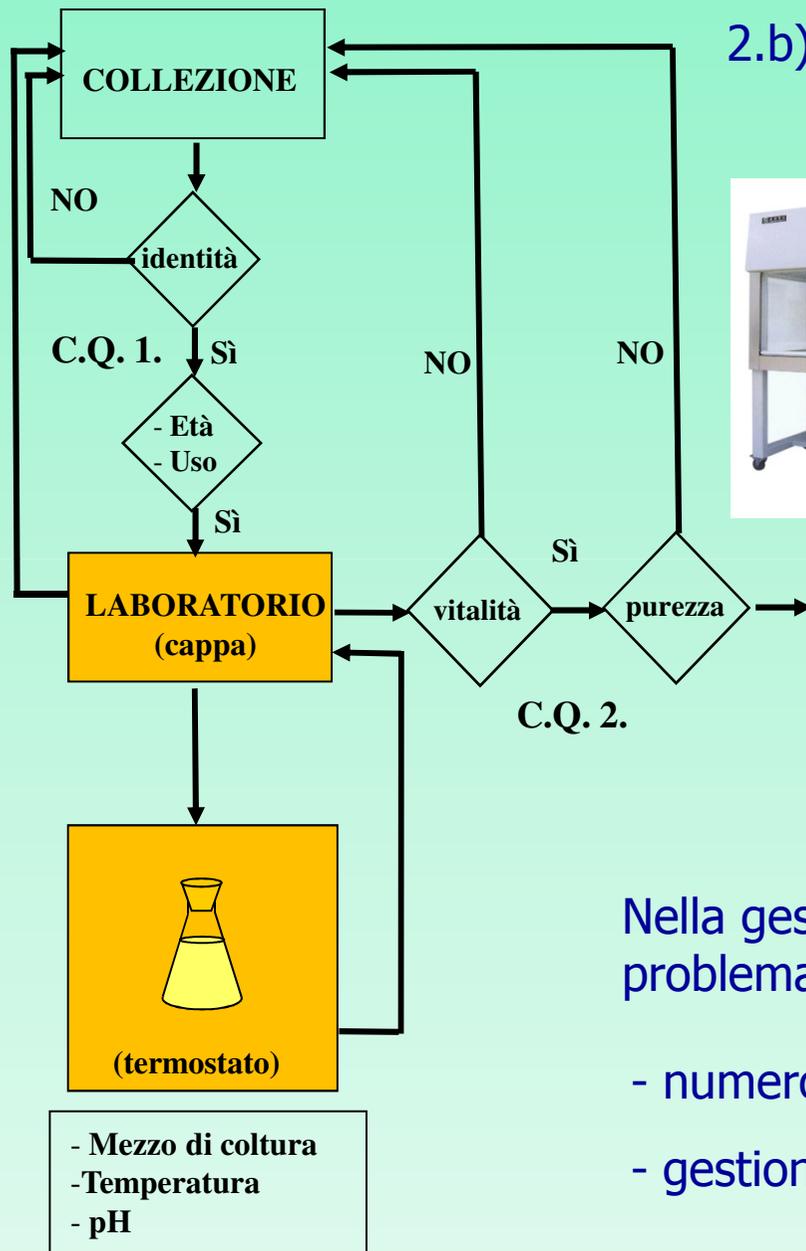


4. Focus sulle prime fasi del processo

2.a) Inoculo del ceppo nel mezzo di coltura - **con ansa**



4. Focus sulle prime fasi del processo



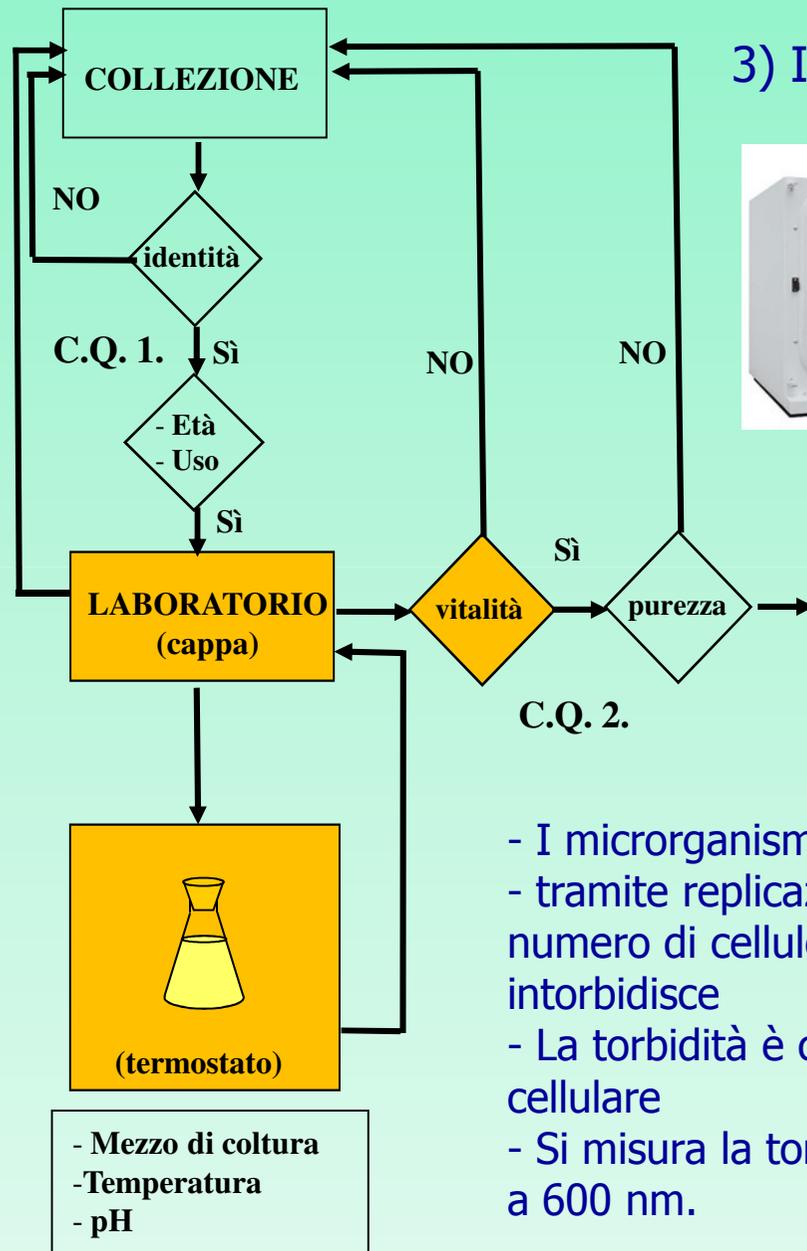
2.b) Inoculo del ceppo nel mezzo di coltura - **scioglimento della coltura**



Nella gestione della collezione, si devono affrontare problematiche diverse a seconda dell'approccio usato:

- numero di repliche nella collezione
- gestione dei campioni in termostato

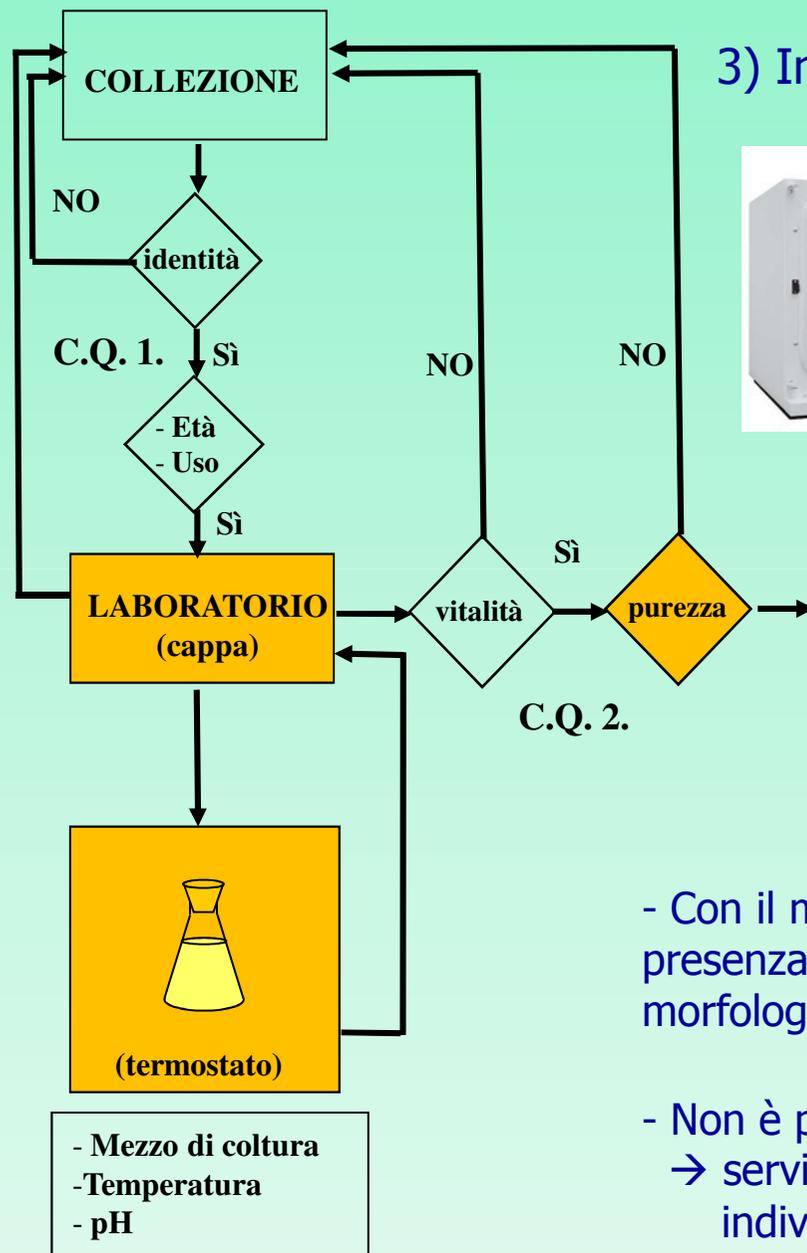
4. Focus sulle prime fasi del processo



Assorbanza della soluzione
a 600 nm

- I microrganismi sviluppano
- tramite replicazioni successive aumenta il numero di cellule e il mezzo di coltura intorbidisce
- La torbidità è correlata con la concentrazione cellulare
- Si misura la torbidità con lo spettrofotometro a 600 nm.

4. Focus sulle prime fasi del processo



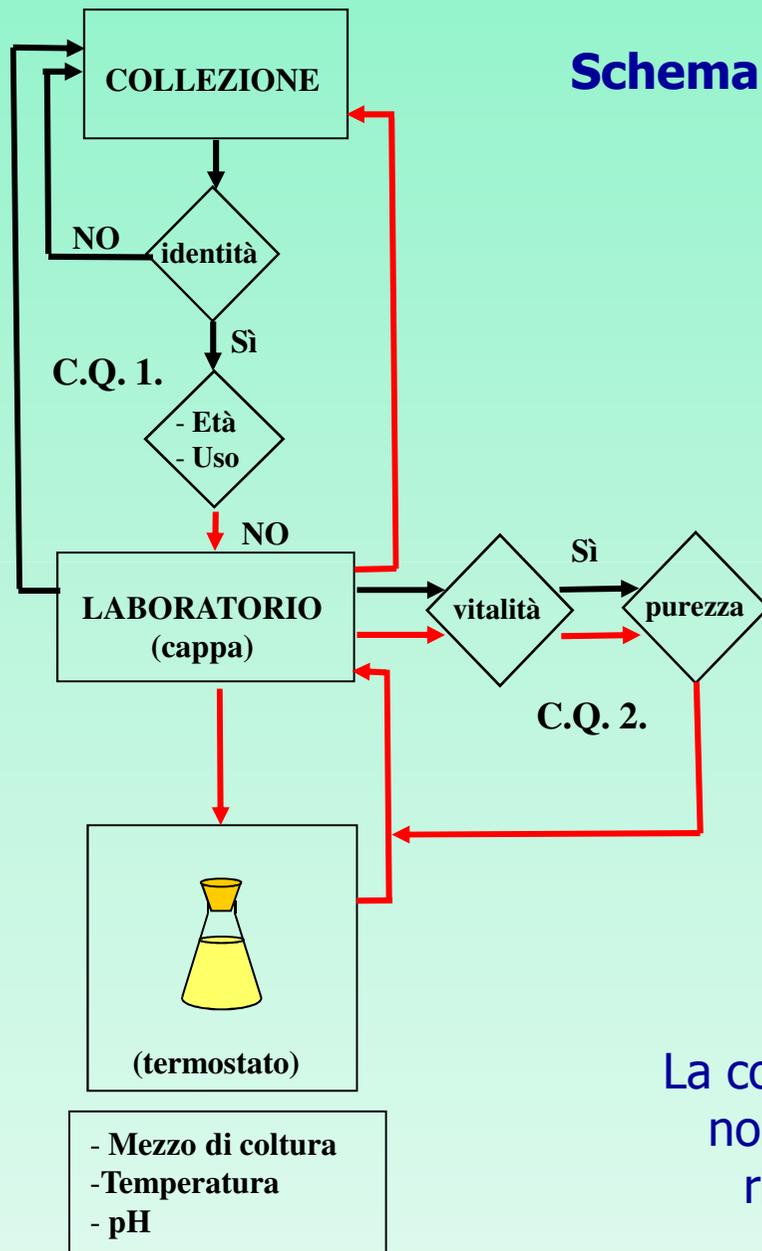
"in tempo reale"

- Con il microscopio è possibile osservare la presenza nel mezzo di coltura di cellule con morfologia diversa, dovute a contaminazioni

- Non è possibile distinguere ceppi della stessa specie
→ servirebbero metodi molecolari più avanzati che individuano specifici marcatori nel genoma del ceppo

4. Focus sulle prime fasi del processo

Schema del processo di rigenerazione di un ceppo



Se nel **CQ1**, risulta negativa la verifica:

- dell'età del campione presente in collezione
- del suo uso (numero prelievi da collezione)

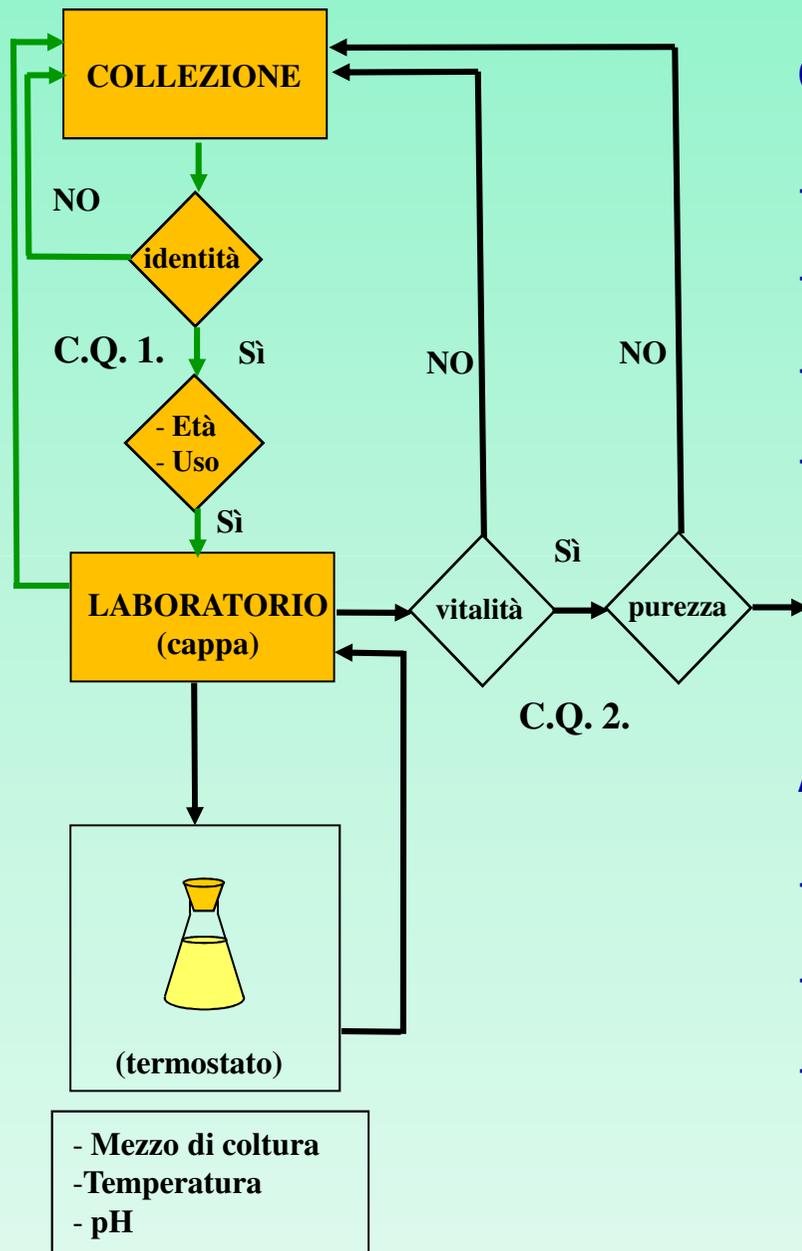
Se nel **CQ2**, risulta negativa la verifica:

- della vitalità (crescita lenta)
- della purezza (contaminanti)



La coltura (eventualmente preceduta da re-isolamento) non porta all'inoculo in fermentatore, ma serve per rigenerare il ceppo nella collezione (**linee rosse**)

4. Focus sulle prime fasi del processo



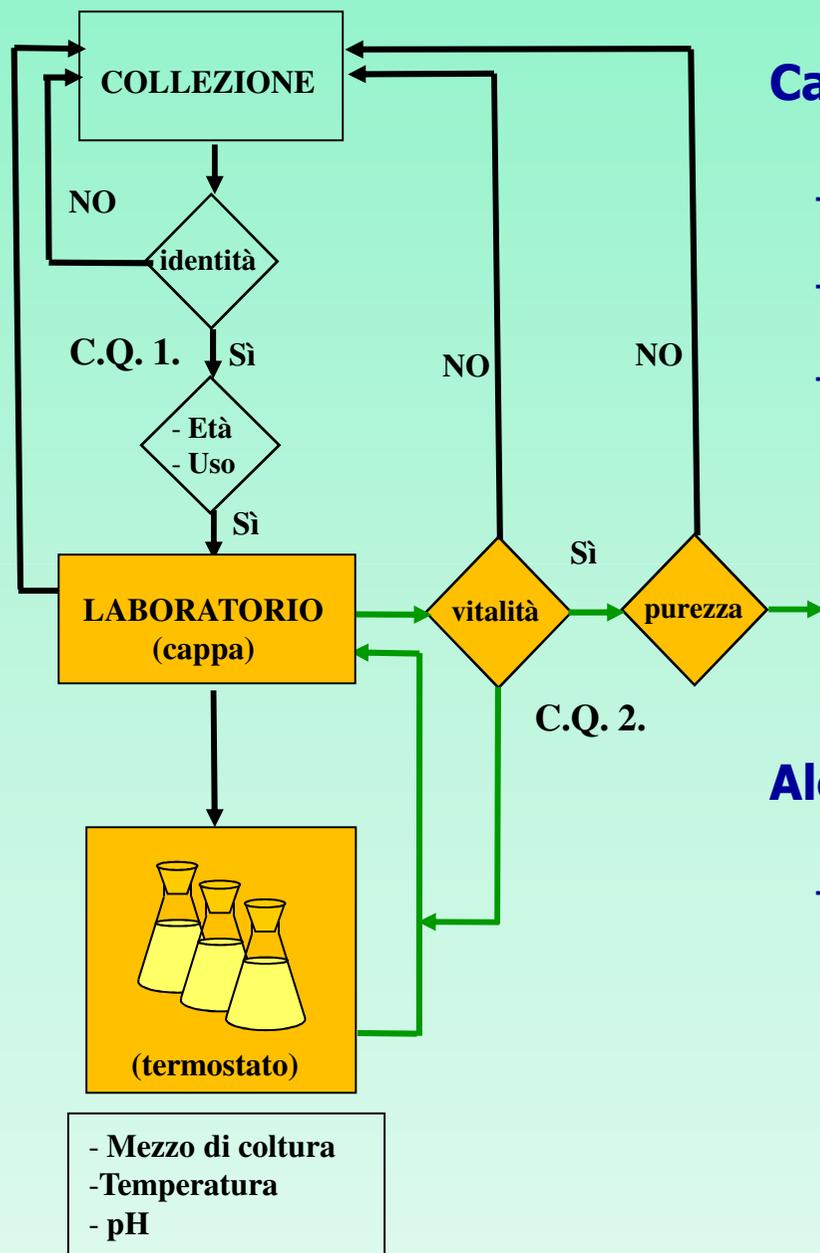
Caso 1: tracciabilità durante l'inoculo

- verifica identità del ceppo
- registra dati prelievo (tempo e Nr. progressivo)
- registra identità dell'operatore
- verifica corretta associazione con il mezzo di coltura presente nella beuta

Alcuni problemi affrontati:

- Tag RFID resistenti a -80°C
- Tag RFID attivi poco dopo il prelievo (-80°C)
- etichette sottili per inserimento nella scatola

4. Focus sulle prime fasi del processo



Caso 2: tracciabilità dei campioni in coltura

- verifica identità della beuta
- registra dati spostamenti
- registra identità dell'operatore

Alcuni problemi affrontati:

- individuazione di hardware per la lettura, senza eccessive interferenze con l'operatore (portali?)