

DOCUMENTO  
TECNICO

**\*Michela Azzolini**  
**\*\*Giacomo Zapparoli**  
**\*\*Gianluca Veneri**  
**\*Emanuele Tosi**

*\*Centro per la Sperimentazione in  
 Vitivinicoltura,  
 Provincia di Verona,  
 Servizio Agricoltura  
 San Pietro in Cariano (VR)*  
*\*\*Dipartimento di Biotecnologie  
 Università degli Studi  
 di Verona - Verona*



M. Azzolini

## INDAGINI MICROBIOLOGICHE SULL'EFFICACIA DEL LISOZIMA NELLA VINIFICAZIONE IN ROSSO

Lo studio valuta l'efficacia del lisozima, aggiunto nel mosto, come agente antimicrobico nella produzione di vino rosso attraverso prove di laboratorio e di cantina. La variabilità della sensibilità al lisozima nelle varie specie di batteri lattici e l'interazione con i polifenoli, rilasciati durante la macerazione delle vinacce, condizionano fortemente la sua capacità di controllo delle contaminazioni pre-fermentative. Si discute sull'opportunità del suo utilizzo nella vinificazione in rosso.

### Introduzione

Il lisozima, composto naturale estratto dall'albumina d'uovo, grazie alla sua attività litica verso i microrganismi Gram-positivi, è impiegato da molti anni per prevenire e controllare lo sviluppo di popolazioni batteriche indesiderate in alcuni alimenti e bevande tra le quali il vino (Charter e Lagarde, 1999). Nonostante dal 1997 il lisozima sia ammesso dall'O.I.V. per il trattamento di

mosti e vini, ad oggi, si stanno ancora valutando vantaggi, rischi ed opportunità di utilizzo.

La caratteristica di maggiore interesse enologico dell'impiego del lisozima riguarda la possibilità di ridurre la quantità di anidride solforosa normalmente utilizzata durante il processo di vinificazione. Infatti quest'ultimo additivo, di sintesi chimica, può essere causa di disturbi per la salute del consumatore e per questo il suo

impiego è strettamente regolamentato (Vally et al., 2009).

L'opportunità di utilizzare il lisozima è legata alla sua reale efficacia nelle varie condizioni di cantina. Precedenti lavori hanno dimostrato che nelle vinificazioni in bianco l'enzima permette di controllare con facilità lo sviluppo dei batteri lattici (LAB) riducendo i rischi di incrementi di acidità volatile nelle fermentazioni alcoliche stentate e impedendo fermentazione malolattiche spontanee inde-

**Tab. 1 - Vitalità cellulare (%) di ceppi di collezione (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSM*) e commerciali in tampone fosfato a pH 3,0, 3,5 e 4,0 misurata dopo 24 ore dal trattamento con 200 mg/L di lisozima**

Microrganismo	ceppo	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM 20174	2	0,9	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	commerciale A	46	22	14
<i>Lactobacillus plantarum</i>	commerciale B	65	30	17
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSM 20176	3	0,5	0,6
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 20054	1	0,7	1
<i>Lactobacillus casei</i>	DSM 20011	100	95	95
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	DSM 12361	0	0	0
<i>Lactobacillus mali</i>	DSM 20483	0	0	0
<i>Lactobacillus vini</i>	DSM 20605	0	0	0
<i>Lactobacillus nagelii</i>	DSM 13675	0	0	0
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331	0	0	0
<i>Oenococcus oeni</i>	DSM 20252	0	0	0
<i>Oenococcus oeni</i>	commerciale	0	0	0

siderate (Tosi et al., 2008; Gao et al., 2002; Delfini et al., 2004). Nelle vinificazioni in rosso invece la sua efficacia non è altrettanto soddisfacente (Gerbaux et al., 1997; Tosi et al., 2008). La causa di ciò deriva principalmente dalla rapida interazione del lisozima con composti polifenolici, pectine e tannini (Tirelli & De Toni, 2007; Chinnici et al., 2009). Queste sostanze, maggiormente presenti nei vini rossi rispetto ai bianchi, causano la precipitazione dell'enzima e quindi la sua inattivazione (Bartwosky et al., 2004). Tirelli e De Toni (2007) hanno espresso dubbi sull'effettiva azione del lisozima contro i LAB nei vini rossi giovani. Dati sperimentali descritti da Isabel et al. (2009) sull'efficacia del lisozima in vino Tempranillo risultano poco chiari. Tuttavia, Delfini et al. (2004) hanno ottenuto risultati positivi con l'aggiunta dell'additivo già all'ammotatura di uve Barbera, quando il contenuto in polifenoli è basso, nonostante una parte non trascurabile dell'enzima si sia legato ai componenti del vino.

La valutazione delle possibilità di impiego del lisozima risulta importante anche a seguito del dibattito ancora

aperto riguardante gli eventuali rischi di risposte allergiche per i consumatori (Weber et al., 2009; Kirschner et al., 2009).

A dimostrazione di questo, l'Unione Europea ha emesso le Direttive 2003/89/EC e 2007/68/EC in materia di indicazione degli ingredienti potenzialmente allergenici contenuti nei prodotti alimentari, compreso l'etichettatura di vino trattato con lisozima.

A seguito di queste considerazioni risulta importante continuare lo studio riguardante l'uso di tale composto per chiarire quando e se sia opportuno il suo impiego.

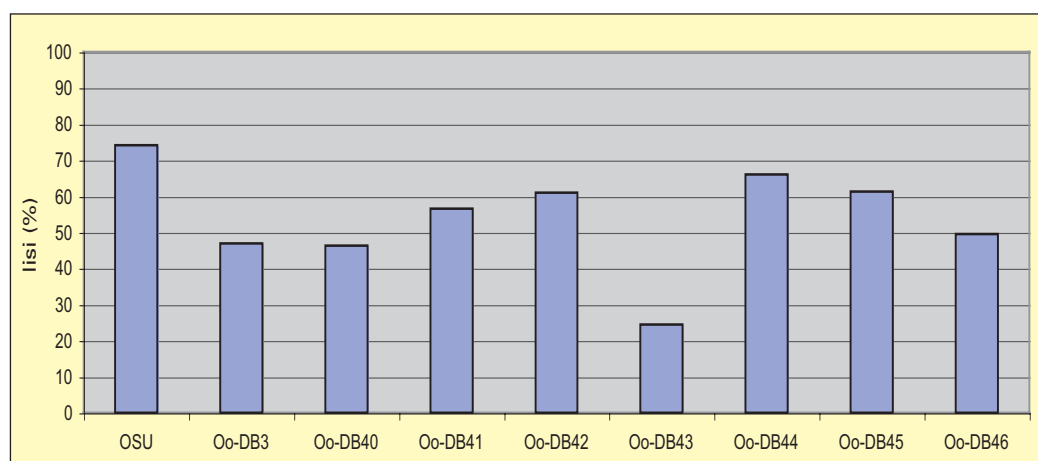
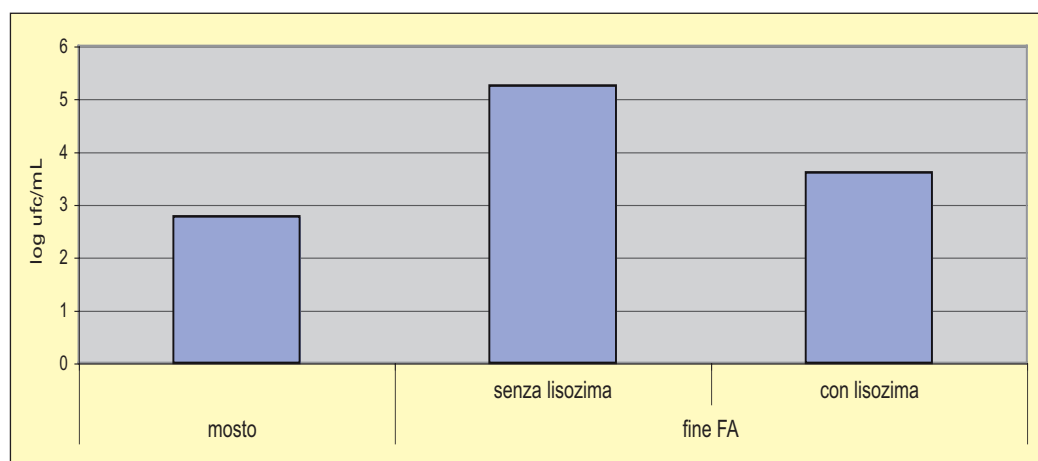
Il presente lavoro si propone di valutare l'efficacia del trattamento in vinificazioni in rosso aggiungendo il lisozima all'ammotatura in presenza di LAB, simulando così una condizione di cantina che renda opportuno il loro controllo. Assieme a prove preliminari di verifica della sensibilità di diversi LAB al lisozima ed a microvinificazioni di cantina, si è potuto valutare l'incidenza dei polifenoli sull'attività litica nei confronti di *Oenococcus oeni*, microorganismo assai sensibile al lisozima, durante la fermentazione alcolica condotta con e senza le vinacce.

## Materiali e metodi

Il lisozima impiegato in tutte le prove di laboratorio e di cantina è un prodotto commerciale *food grade* con attività dichiarata di 22800 U/mg.

**Saggio di sensibilità dei LAB al lisozima.** Sono stati saggiati per la sensibilità al lisozima un totale di 13 ceppi di LAB mediante test di laboratorio. Le cellule batteriche, in fase di crescita stazionaria, sono state inoculate alla concentrazione di  $10^7$  ufc/mL in tampone fosfato a diversi pH (3,0, 3,5 e 4,0) rispettivamente in presenza ed in assenza di lisozima (200 mg/L). È stata confrontata la vitalità cellulare (% di ufc/mL) nella tesi trattata rispetto a quella di controllo, mediante semina in terreno MRS addizionato con il 10% p/v di succo di pomodoro, dopo una incubazione di 24 ore a 28°C.

**Attività del lisozima nei confronti di *Oenococcus oeni*.** L'attività è stata valutata in 9 ceppi di *O. oeni* mediante saggio enzimatico turbidimetrico. Ad una sospensione cellulare di circa 1,0 O.D.<sub>600</sub> in tampone fosfato 70 mM pH 6,6 sono stati ag-

**Fig. 1 - Percentuale di lisi di cellule di ceppi di *O. oeni* ottenuta tramite saggio enzimatico turbidimetrico a 540 nm****Fig. 2 - Microvinificazione I. Carica batterica ( $\log_{10}$  ufc/mL) nel mosto e a fine FA con e senza lisozima (200 mg/L)**

giunti 400 mg/l di lisozima. Dopo 17 ore a 28°C si è effettuata la lettura spettrofotometrica a 540 nm e l'attività litica è stata misurata nella tesi trattata, espressa come percentuale rispetto a quella di controllo (senza lisozima).

**Microvinificazioni.** Sono state effettuate due microvinificazioni di uve della varietà Cabernet Sauvignon in cantina e una in laboratorio.

Nella prima microvinificazione di cantina sono stati impiegati volumi di 2000 kg per tesi. La composizione del mosto era 25,2° Brix, 5,20 g/L di acidità totale in acido tartarico, pH 3,55, 2,58 g/L di acido L-malico. La massa ottenuta è stata separata in due serbatoi: in uno sono stati aggiunti 200 mg/L di lisozima precedentemente disciolto

in acqua, mentre l'altro non è stato trattato con l'enzima (tesi di controllo). La massa e le vinacce sono state mescolate accuratamente. Per indurre la fermentazione alcolica (FA) è stato impiegato un lievito commerciale.

Nella seconda microvinificazione di cantina i volumi di ciascuna tesi erano di 100 kg. La composizione del mosto era di 22,3° Brix, 5,30 g/L di acidità totale in acido tartarico, pH 3,41, 1,54 g/L di acido L-malico. La massa e le bucce ottenute sono state divise in quattro serbatoi da 100 L, due addizionati con 400 mg/L di lisozima e due controlli senza additivo. La fermentazione è stata condotta da un lievito starter.

La microvinificazione di laboratorio è stata allestita per valutare l'attività del lisozima nei confronti di

*Oenococcus oeni* utilizzando un volume di 1,5 L. La composizione del mosto era 20,7° Brix, 3,65 g/L di acidità totale in acido tartarico e pH 3,63. Sono state allestite tesi con e senza vinacce entrambe addizionate di 150 mg/L di lisozima. Dopo pastorizzazione è stato inoculato un lievito commerciale. La FA è stata monitorata mediante calo in peso espresso in percentuale di CO<sub>2</sub> prodotta.

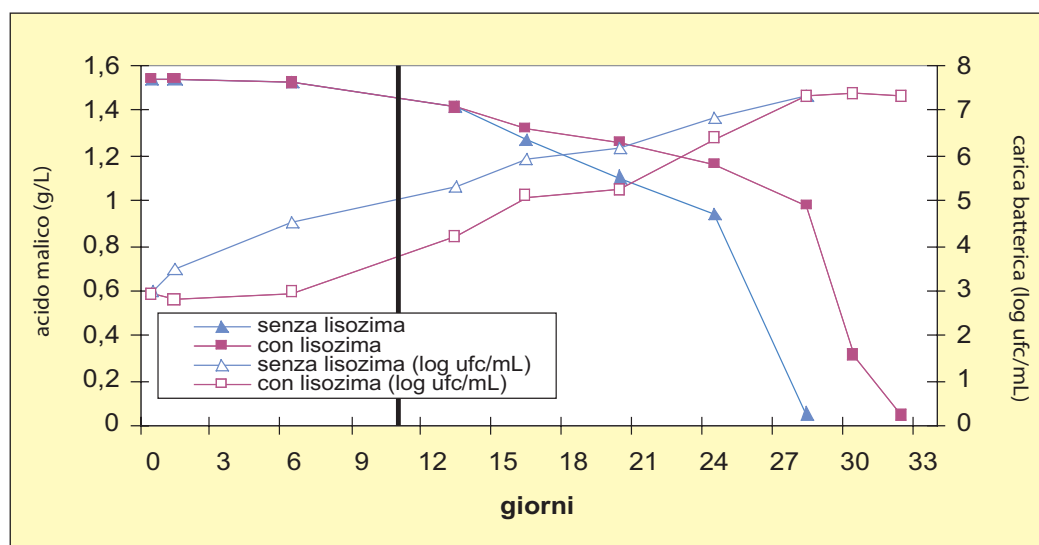
**Analisi dei mosti e dei vini.** Il contenuto in etanolo è stato analizzato tramite spettroscopia NIR. Gli acidi organici sono stati determinati tramite metodi enzimatici. La concentrazione di polifenoli è stata quantificata con il reagente Folin-Ciocalteu, mentre gli antociani sono stati determinati con il metodo Glories.

La quantificazione del lisozima è stata condotta in HPLC seguendo il protocollo descritto da Daeschel et al. (2002). È stata usata una colonna Phenomenex Gemini C18,5 mm e come solventi acetonitrile, acido trifluoroacetico e acqua deionizzata.

## Risultati e discussione

**Sensibilità dei LAB al lisozima.** La Tab. 1 mostra la differente sensibilità al lisozima di LAB del genere *Lactobacillus*, *Pediococcus* ed *Oenococcus*. Reazioni differenti all'attività muramidasi sono state osservate non solo tra LAB di generi diversi ma anche tra ceppi appartenenti alla stessa specie, come nel caso di *L. plantarum*, in accordo con precedenti studi (Delfini et al., 2004; Gao et al., 2002). *L. casei* è risultato il meno sensibile al lisozima. Percentuali basse, ma significative e sufficienti per un'eventuale ricrescita, sono state osservate in *L. plantarum* DSM 20174 e nei ceppi di *L. brevis* e *L. hilgardii*. Decisamente sensibili sono risultati gli altri ceppi, nei quali l'esposizione a 200 mg/L di lisozima per

**Fig. 3 - Microvinificazione II. Confronto delle cinetiche di degradazione dell'acido malico e di sviluppo microbico nelle tesi senza lisozima e con 400 mg/l di enzima. La linea nera verticale indica la fine della FA**



24 ore ha determinato la morte di tutta la popolazione.

Ulteriori indagini sono state condotte per verificare l'attività del lisozima verso alcuni ceppi di *O. oeni*, microorganismo di riferimento per la conduzione delle fermentazioni malolattiche in vino, mediante un saggio di lisi cellulare. Come mostra la Fig. 1 le risposte sono state assai varie tra i diversi ceppi testati. Anche Delfini et al. (2004) avevano osservato differente grado di sensibilità al lisozima in diversi ceppi di *O. oeni*.

**Effetti del lisozima durante la vinificazione.** Da analisi microbiologiche condotte al termine della FA, durata 19 giorni, monitorata durante una prima microvinificazione preliminare, si è osservato come 200 mg/L di lisozima aggiunti nel mosto (con carica iniziale di circa 1000 ufc/mL) abbiano determinato solo un parziale abbattimento (circa 30%) della popolazione naturale rispetto al controllo (Fig. 2). Le indagini sulla composizione di queste popolazioni di LAB hanno evidenziato la dominanza della specie *O. oeni* (dati non mostrati).

Considerando l'elevata sensibilità di questa specie al lisozima (come sopra riportato), è ipotizzabile che con con-

taminazioni costituite da altre specie, quali *L. plantarum* tra le più comuni presenti nel mosto, il trattamento si sarebbe rilevato ancora meno efficace.

Sulla base di questi risultati è stata allestita una seconda microvinificazione, usando una dose doppia di lisozima (400 mg/L) addizionata al mosto che conteneva una carica di LAB simile alla precedente. Anche in questo caso la crescita della popolazione indigena di LAB è stata solamente ritardata rispetto a quella nella tesi di controllo, senza che vi sia stato un efficace abbattimento (Fig. 3). Alla fine della FA, non si è osservata differenza nel contenuto in acido L-malico. Monitorando la popolazione anche dopo la svinatura si è osservato, nelle tesi trattate con lisozima, che i batteri avevano una concentrazione simile a quella presente nella tesi di controllo. In termini di durata della FML spontanea si è osservata solo una differenza di 5 giorni tra le due tesi (Fig. 3). Come nella precedente prova la popolazione che ha dominato sia la tesi trattata sia quella di controllo era costituita da *O. oeni* (dati non mostrati). Pertanto il trattamento enzimatico con la dose di 400 mg/L ha avuto un modesto effetto inibitorio verso una specie assai sensi-

bile al lisozima, confermando precedenti osservazioni (Tosi et al., 2008).

**Attività del lisozima in presenza e in assenza di vinacce.** Con la microvinificazione di laboratorio si sono valutate le conseguenze dell'interazioni polifenoli-lisozima sull'attività litica verso i LAB durante la FA condotta in due tesi, una con e l'altra senza le vinacce. Le differenze osservate tra le due tesi, sia nella quantificazione del lisozima sia nell'attività litica verso il ceppo *O. oeni* DB3, dimostrano che i polifenoli rilasciati durante la macerazione delle vinacce interferiscono negativamente sull'efficacia dell'enzima. Infatti, in assenza di vinacce il lisozima rimane attivo anche a fine FA (100% di CO<sub>2</sub> sviluppata) determinando la lisi cellulare, mentre con le vinacce il suo effetto è praticamente nullo. Questi risultati trovano conferma con la quantificazione del lisozima solubile nel vino (Fig. 4). Quindi all'aumentare del contenuto dei composti polifenolici (Fig. 5) l'attività del lisozima viene seriamente compromessa come evidenzia la rapida perdita della capacità litica nei confronti di *O. oeni* DB03.

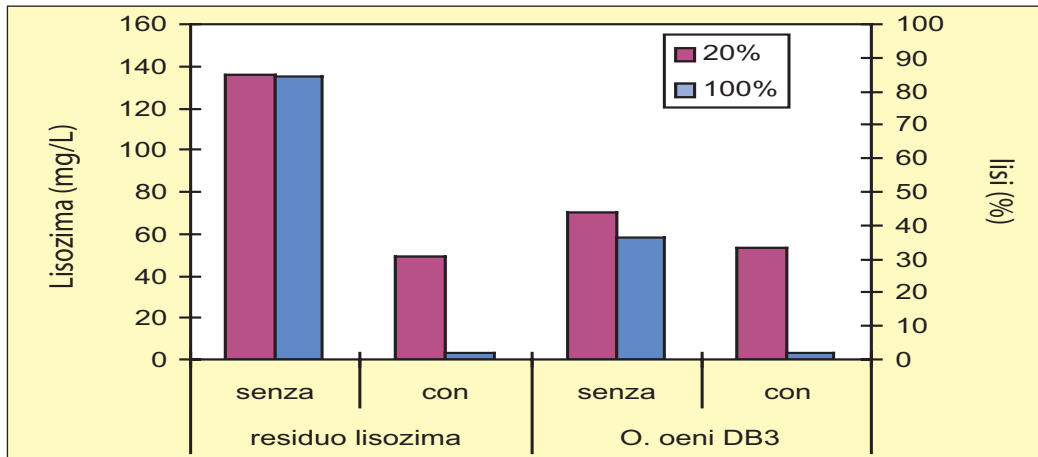
## Considerazioni conclusive

Sebbene si siano valutate solo alcune delle possibili condizioni di vinificazione nel quale il produttore può operare (legate alla variabilità delle uve, alla tecnologia di cantina, al grado e tipo di contaminazione), il presente studio fornisce utili elementi di valutazione dell'efficacia del lisozima nella vinificazione in rosso. In particolare, si evidenzia come il suo effetto nei mosti di uve a bacca rossa può essere limitato dal grado e dal tipo di contaminazione batterica in concomitanza alla presenza di composti polifenolici.

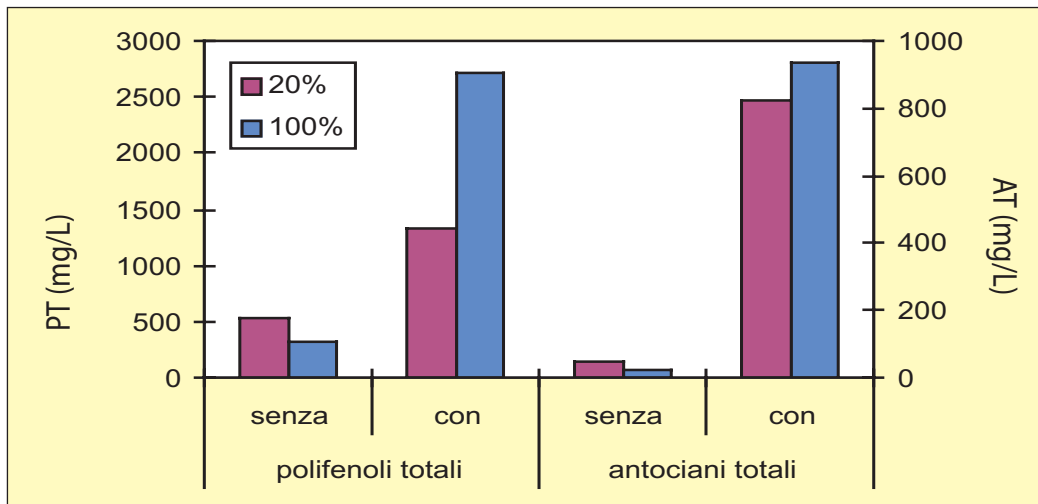
Si ritiene che questo additivo possa esercitare un controllo della microflora lattica qualora la carica sia limitata (<10<sup>3</sup> ufc/mL), mentre nel



**Fig. 4 - Microvinificazioni di laboratorio in presenza o assenza di vinacce. Percentuale di lisi delle cellule di *O. oeni* e concentrazione (mg/L) dell'enzima al 20 e 100% (fine FA) di CO<sub>2</sub> prodotta**



**Fig. 5 - Microvinificazioni di laboratorio in presenza o assenza di vinacce. Concentrazione di polifenoli totali, PT (mg/L), e antociani totali, AT (mg/L) al 20 e 100% (fine FA) di CO<sub>2</sub> prodotta**



caso di contaminazioni più elevate il suo impiego possa essere addirittura ininfluenza. Ne consegue che per poter utilizzare con successo il lisozima, quale coadiuvante enologico per il controllo della carica microbica nei mosti, è importante attuare tutte quelle procedure igienico-sanitarie necessarie al fine di evitare una eccessiva proliferazione batterica durante i processi produttivi.

Infine, la scelta di utilizzare il lisozima per il controllo dei LAB dovrà tenere conto sia della discussione a livello europeo sull'obbligo di inserire nell'etichettatura dei vini (come avviene già oggi per i solfiti) l'uso di prodotti potenzialmente allergenici, co-

me il lisozima, sia del costo del trattamento, che seppur non eccessivo, può influire sul bilancio finale di produzione.

## Bibliografia

Charter E.A. & Lagarde, G. Lysozyme and other proteins in eggs. (1999) In Encyclopedia of Food Microbiology ed. Batt, C.A., Robinson, R.K., Patel, P. and Patel, P.D. pp. 1582-1587. Adelaide, London and New York: Academic Press.

Chinnici F., Riponi C., Sonni F., Pirrone L., Bellachioma A., Cavagna M. Interazione fra il lisozima estratto da uovo ed alcuni macrocomponenti di mosti e vini.

(2009) *L'Enologo* 11: 77-82.

Daeschel M. A., Musafija-Jeknic T., Bizzarri D., Volla, A. High-Performance Liquid Chromatography analysis of lysozyme in wine. (2002) *Am. J. of En. and Vitic.*, 53: 154-157.

Delfini C., Cersosimo M., Del Prete V., Strano M., Gaetano G., Pagliara A., Ambrò S. Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: Efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. (2004) *J. Agric. Food Chem.* 52: 1861-1866.

Gao C. Y.; Zhang G.; Krentz S.; Darius S.; Power J.; Lagarde G. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation. (2002) *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 8: 76-83.

Gerbaux V., Villa A., Monamy C., Bertrand A. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. (1997) *Am. J. Enol. Vitic.* 48:1:49-54.

Isabel L., Santamaria P., Tenorio C., Garijo P., Gutierrez A.R., Lopez R. Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. (2009) *J Microbiol Biotechnol.* 19(9): 1005-12.

Kirschner S., Belloni B., Kugler C., Ring J., Brockow K. Allergenicity of Wine Containing Processing. (2009) *J Investig Allergol Clin Immunol* 19(3): 210-217.

Tirelli. & De Noni. Evaluation of lysozyme stability in young red wine and model systems by a validated HPLC method. (2008) *Food chem.* 105: 1564-1570.

Tosi E., Azzolini M., Cristofolletti M., Zapparoli G. Il lisozima ritarda nei rossi e blocca nei bianchi la malolattica. (2008) *L'informatore agrario* 22: 55-59.

Vally H. & Thompson, P. J. Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. (2003) *Addiction Biology* 8: 3-11.

Weber P., Kratzin H., Brockow K., Ring J., Steinhart H., Paschke A. Lysozyme in wine: A risk evaluation for consumers allergic to hen's egg. (2009) *Mol. Nutr. Food Res.* 53: 1469-1477.