Relazione Scientifica Attività di Ricerca svolta dal Dottor Gianluca Bleve presso il laboratorio di Microbiologia dell'Harvard Medical School di Boston, USA nel periodo compreso tra il 27 Ottobre 2014 ed il 26 Novembre 2014.

Obiettivo: Il lavoro di ricerca svolto ha riguardato la messa a punto di sistemi di studio in vitro delle interazioni e dei meccanismi di cross-talk inter-specie e inter-regno tra lieviti, batteri lattici e funghi associati alla produzione di prodotti alimentari fermentati (vino ed olive da tavola fermentate).
Introduzione

Il vino e i microrganismi associati
Il vino è un alimento fermentato che deriva dall'azione di diversi microrganismi associati naturalmente alle drupe, e che sono in grado di effettuare una fermentazione spontanea, o selezionati come starter ed inoculati dall'esterno nel mosto e nel mosto fermentato.
La vinificazione moderna nasce da un fenomeno spontaneo che l'uomo, nei millenni, ha saputo osservare e controllare. Tuttavia ben poco è noto dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della co-esistenza di lieviti e batteri e di quanto essi si siano influenzati reciprocamente nell'evoluzione millenaria in questa nicchia ecologica.
Il complesso processo di modificazione del mosto d'uva in vino avviene attraverso due fermentazioni, la alcolica (FA) e la malolattica (FML). Quest'ultima comporta una migliorata stabilità microbiologica e una modificazione della complessità aromatica, è desiderata in molti stili di vino, ma non in tutti (Lonvaud-Funel, 1999).
La FA è suddivisa in due fasi, una prima ad opera dei lieviti apiculati ed una seconda ad opera di lieviti ellittici, in particolare *Saccharomyces cerevisiae*, mentre la FML è operata da batteri malolattici (BML), tra cui *Oenococcus oeni*, appartenente ai batteri lattici (lactic acid bacteria, LAB).
Per le difficoltà che possono presentarsi nella gestione delle fermentazioni spontanee, è diffuso l'impiego in cantina di colture selezionate, e, recentemente, si è diffusa la pratica del co-inoculo (Du Toit et al., 2011), perciò diventa di cruciale importanza l'analisi delle interazioni tra lieviti e BML, che si possono distinguere fenomeni di inibizione e fenomeni di stimolazione.
Per quanto riguarda i fenomeni di inibizione, la capacità di alcuni ceppi di lievito di inibire la FML è stata riportata in diversi studi (v. Alexandre et al., 2004 e relative referenze) con una influenza negativa sulla produzione e qualità del vino, ma solo pochi mirano a delucidare i meccanismi molecolari di interazione. Per quanto riguarda la stimolazione, è un fenomeno poco studiato sinora, benché sia noto che vini prodotti da alcuni ceppi di lievito consentono una crescita migliore
di BML in confronto ad altri (Alexandre et al., 2004).
È interessante notare che anche le pratiche di vinificazione impiegate influiscono sulle prestazioni di combinazioni enologiche di lieviti e batteri (Edwards et al., 1990; Guilloux-Benatier & Feuillat, 1993; Guilloux-Benatier et al., 1995 e 1998).
In ogni caso l'effetto sulla fermentazione batterica è quasi sempre dipendente dal ceppo di lievito coinvolto e lo stesso ceppo di lievito può inibire o stimolare diversi ceppi di O. oeni in condizioni di vinificazione (Alexandre et al., 2004; Rossouw et al., 2012).
Questi dati, nel loro complesso, mostrano quanto le interazioni tra lieviti e batteri siano veramente importanti ma ancora poco studiate con approcci avanzati.
E' ben dimostrato come proteine e peptidi siano coinvolti nelle comunicazioni microbiche cellula-cellula in diversi organismi modello (Keller & Surette, 2006; Wuster & Babu, 2007; Hogan, 2006; Williams, 2007; Huang & Fraenkel, 2009; Eberl & Riedel, 2011; Di Cagno et al., 2011; Bojsen et al., 2012), tuttavia, allo stato attuale non esistono studi pubblicati sull'analisi dell'interazione biologica tra *S. cerevisiae-O. oeni* e, di conseguenza, non ci sono informazioni sui pathways e sui segnali proteici o chimici coinvolti in queste dinamiche, benché sia noto che ceppi di *S. cerevisiae* producono peptidi antibatterici in grado di inibire i BML (Dick et al., 1992; Capucho & San Romao, 1994; Comitini et al., 2005; Nehme et al., 2010) e, relativamente a *S. cerevisiae*, tre studi

hanno analizzato la proteomica di ceppi commerciali durante la FA (Rossignol et al., 2009; Gómez-Pastor et al., 2010; Rossouw et al., 2010), mentre gli studi di proteomica su questo batterio sono ancora scarsi (Silveira et al., 2004; Cecconi et al., 2009; de los Rios et al., 2011).
Il signalling cellula-cellula è un prerequisito per lo sviluppo degli organismi pluricellulari, ma si è evoluto anche nei batteri e funghi unicellulari e l'interesse è crescente per i) la rilevanza del quorum sensing (QS) in vari processi correlati alle malattie e ii) l'osservazione che il QS sembra essere un meccanismo quasi universale negli organismi unicellulari, con una moltitudine di sistemi QS che potrebbero essere in attesa di scoperta. Il QS è un processo di comunicazione cellula-cellula grazie al quale ogni singola cellula regola il proprio fenotipo, in risposta alla concentrazione extracellulare di una o più molecole che si legano a proteine sensore e quindi influenzano la trascrizione e la traduzione (Wuster & Babu 2007, Hughes & Sperandio, 2008; Pai & You 2009).

Olive da tavola e microrganismi associati
La produzione di olive è una delle maggiori pratiche agronomiche di Paesi del Mediterraneo come Italia, Grecia e Spagna. Le olive da tavola sono uno dei più importanti prodotti vegetali tradizionali fermentati delle nazioni del Sud Europa e la loro produzione e consumo sono in costante aumento. La produzione mondiale di olive corrisponde a 2 milioni di tonnellate per anno, di cui il 38% è prodotto in Spagna, Italia e Grecia. La produzione italiana di olive da tavola si colloca intorno a 70000 tonnellate, concorrendo per circa il 10% alla produzione mondiale e per il 20% a quella dell'Unione Europea (IOOC, 2013). Le olive nere naturali, prodotte secondo il metodo greco, sono uno dei prodotti commerciali più importanti nel mercato internazionale, insieme alle olive verdi prodotte con il metodo spagnolo e quelle nere ossidate conosciute come olive derivanti dal metodo californiano.
Secondo il metodo greco, le olive vengono immerse in salamoia contenente una concentrazione salina compresa tra 6-10% (peso/volume). In queste condizioni avviene una fermentazione naturale, che richiede per il suo completamento dagli 8-12 mesi di tempo ed è operata da un consorzio di microorganismi epifiti costituito da lieviti e batteri lattici (LAB) (Brenes et al., 2004; Romero et al., 2004).
Allo stato attuale della tecnologia, viene considerato come il passaggio più importante nel processo di produzione delle olive da tavola, il processo di fermentazione lattica ad opera dei batteri lattici, in quanto esso è responsabile: i) della deamarizzazione delle olive; ii) del decremento del pH della salamoia, con una riduzione del rischio di possibile crescita di microrganismi deterioranti o patogeni, ii) della formazione di caratteristiche organolettiche e di consistenza ottimali del prodotto finito (Panagou et al., 2008).
Recentemente è stato preso in considerazione anche un possibile ruolo dei lieviti nella preparazione e conservazione delle olive da tavola. Infatti, tali microrganismi possono influenzare positivamente le fermentazioni mediante la produzione di molecole volatili e metaboliti in grado di migliorare le caratteristiche organolettiche del prodotto finale, mediante il rilascio di sostanze nutritive che favoriscono la crescita dei LAB e grazie alla loro capacità di bio-riduzione di composti fenolici indesiderati. I lieviti, tuttavia, possono anche essere causa di problematiche durante il processo di produzione in quanto possono essere responsabili della formazione di gas pocket, del rammollimento delle olive, del rigonfiamento del packaging, dell'opacità delle salamoie o della produzione di sapori e odori indesiderati (Arroyo-Lopez et al., 2008).
Attualmente, i processi di fermentazione sono spontanei, non prevedibili e fortemente influenzati dalle condizioni chimico-fisiche, dalla disponibilità di substrati fermentabili e dal contenuto in sale, così come dai microrganismi presenti come contaminanti delle drupe.
Per molti anni la ricerca di starter per applicazioni nella fermentazione di olive da tavola è stata focalizzata sull'attività dei LAB. Sulla base di tale attività di ricerca, per il controllo delle fermentazioni e per la produzione di prodotti di alta qualità, è stato proposto l'impiego di colture starter di batteri lattici, tra cui *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* in singola coltura o in miscela.

Solamente negli ultimi anni si sono cominciate a valutare l'importanza e le potenziali applicazioni di lieviti nel processo di produzione delle olive da tavola (Bevilacqua et al., 2013; Heperkan, 2013).
Durante la fermentazione delle olive da tavola secondo il metodo greco, spesso si trovano associate muffe che crescono sulla superficie dei contenitori. Finora, questi microrganismi non sono stati considerati come possibili attori del processo di trasformazione delle olive, ma la loro presenza e convivenza in questo ambiente insieme a LAB e lieviti li rende molto interessanti in un'ottica di studio delle interazioni molecolari e metaboliche che avvengono in questa nicchia ecologica (Baffi et al., 2012).
Dallo studio delle fermentazioni spontanee secondo il metodo greco di differenti cultivar di olive da tavola italiane e greche (Bleve et al., 2014; Bleve et al. 2015), dall'isolamento di lieviti, LAB e muffe ad esse associati è stato possibile ottenere una collezione di microrganismi che sono stati impiegati per effettuare formulazioni di starter microbici autoctoni per guidare le fermentazioni (Bleve et al., 2013) e per effettuare studi di interazione tra microrganismi appartenenti a differenti regni.

Attività sperimentale

Vino

Un primo esperimento è consistito nel valutare la possibilità di impiegare un sistema di co-coltura liquido-solida che prevede l'inoculo di uno o di entrambi i lieviti *S. cerevisiae* ed *H. uvarum* su un mezzo solido, immerso nello stesso mezzo liquido in cui viene inoculato il batterio *O. oeni*. Come riportato in Figura 1, il sistema consiste di un primo comparto (comparto 1) (well millicell Millipore) costituito da una cella dotata al fondo di una membrana semipermeabile con pori da 1 mm di diametro e su cui viene deposto uno strato di agarosio 0.9% (w/v) e di un secondo comparto rappresentato da un'ulteriore cella (comparto 2) (multiwell, Falcon) in cui viene inserito il terreno liquido.
Sulla superficie dell'agarosio del comparto 1 viene depositata la coltura di lievito mediante un'ansa, mentre nel mezzo liquido del comparto 2 viene inoculata la coltura batterica.
Il terreno liquido utilizzato è il Synthetic grape juice medium (Nehme et al., 2010) con alcune modfiche (SGM): glucosio 100 g/l, fruttosio 100 g/l, Yeast Extract 1 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/l, acido citrico 0.3 g/l, acido L-malico 5 g/l, acido L-tartarico 5 g/l, $MgSO_4$ 0.4 g/l e KH_2PO_4 5 g/l, NaCl 0.2 g/l, $MnSO_4$ 0.05 g/l, pH 4.3.
I ceppi di lievito impiegati provengono dalla collezione dell'ISPA-CNR di Lecce.
Dopo 2 giorni dall'inoculo è stato possibile constatare che il sistema di interazione così ideato non risulta essere funzionale, poiché i lieviti crescono in modo incontrollato sulla superficie dell'agarosio, richiamando per osmosi liquido dal comparto sottostante, provocando un'espansione della colonia e formano bolle di CO_2 sotto la superficie della cella del comparto 1 (Figura 2 Pannello B).
Il secondo approccio utilizzato ha previsto l'impiego di terreni solidi per lo studio delle interazioni tra lieviti e batterio del vino.
Per questo esperimento sono stati preparati i seguenti terreni:
SGM, SGM con aggiunta di 5 % (v/v) di etanolo e SWM con aggiunta di 10% (v/v) di etanolo. Quest'ultimo terreno è stato realizzato apportando alcune modifiche a quanto descritto da Nehme et al. (2010): glucosio 0.5 g/l, fruttosio 0.5 g/l, Yeast Extract 0.5 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 g/l, acido citrico 0.3 g/l, acido L-malico 4 g/l, acido L-tartarico 5 g/l, $MgSO_4$ 0.2 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, pH 4.3.
Tutte le possibili combinazioni tra i lieviti *S. cerevisiae* ed *H. uvarum* ed il batterio *O. oeni* sono state studiate depositando un inoculo pari a 0.5 µl ed 1 µl di colture pure su ciascuno dei tre terreni SGM, SGM+5% etanolo ed SWM+10% etanolo. Nel caso dell'inoculo di 0.5 µl si è proceduto con il deposito di 3-6 gocce in linea a distanza di 3-4 mm l'una dall'altra, mentre nel caso dell'inoculo

di 1 µl è stata deposta una singola goccia di coltura. Al fine di riprodurre quanto si osserva durante la fermentazione spontanea dei vini, gli inoculi effettuati contenevano la seguente quantità di cellule: per il lievito *S. cerevisiae* 10^3 CFU/µl, per il lievito *H. uvarum* 10^5 CFU/µl, per il batterio *O. oeni* 10^3 CFU/µl. Dopo incubazione per 14 giorni a temperatura ambiente in assenza di ossigeno, si è potuto constatare che i lieviti erano in grado di crescere in tutte e tre le condizioni, mentre si è potuto notare la crescita del batterio *O. oeni* solo nel terreno SWM+10% etanolo (Figure 3-4-5).

In natura la fermentazione malo-lattica avviene al termine della fermentazione alcolica, quando si registra una elevata concentrazione di cellule e metaboliti prodotti da *S. cerevisiae*. Per valutare l'esistenza di un possibile gradiente di molecole prodotte dal lievito *S. cerevisiae* e in grado di favorire o meno la crescita del batterio *O. oeni*, è stato effettuato un ulteriore esperimento di interazione su SWM al 10%(v/v) di etanolo secondo lo schema riportato in Figura 6. Dalle osservazioni effettuate durante questo esperimento e, in accordo a quanto riportato in letteratura, il lievito *S. cerevisiae* è risultato essere in grado di interagire con il batterio *O. oeni*.

Dopo 6 giorni di incubazione a temperatura ambiente in assenza di ossigeno, si è potuto constatare un effetto da parte del lievito sulla crescita batterica a seconda della distanza del batterio dall'inoculo del lievito (Figura 6). L'inoculo del lievito con un fronte più ampio che un singolo spot ha prodotto un effetto più marcato sulla crescita del batterio.

Per valutare il peso di tale interazione da parte di *S. cerevisae* nel favorire la crescita di *O. oeni*, un inoculo di lievito *S. cerevisiae* in una concentrazione pari a 10^3 CFU/µl è stato fatto crescere in SWM+10% (v/v) di etanolo a pH 4.5 per 38 ore in agitazione a temperatura ambiente. Il supernatante di tale coltura è stato impiegato in differenti percentuali per costituire del terreno fresco SWM+10% (v/v) di etanolo a pH 4.5 solido su cui depositare un inoculo del batterio *O. oeni* in una concentrazione pari a 10^3 CFU/µl. Lo schema seguito è stato il seguente:

- terreno 100% SWM trattato con *S. cerevisiae*
- terreno 50% SWM trattato con *S. cerevisiae*+ 50% SWM fresco
- terreno 10% SWM trattato con *S. cerevisiae*+ 90% SWM fresco
- terreno 5% SWM trattato con *S. cerevisiae*+ 95% SWM fresco
- terreno 1% SWM trattato con *S. cerevisiae*+ 99% SWM fresco
- terreno 100% SWM fresco

Come si può osservare in Figura 7, il terreno precedentemente trattato con *S. cerevisiae* è risultato essere in grado di favorire maggiormente la crescita di *O. oeni* in concentrazioni comprese tra 1 e 5%. In concentrazioni pari a 10-50% produce effetti sulla crescita pari al controllo contenente SWM non pretrattato; se utilizzato al 100% il terreno pretrattato è risulta o essere inibente per la crescita del batterio.

Olive da tavola

Per gli esperimenti di interazione sono stati utilizzati i seguenti ceppi riportati in Tabella 1, isolati presso l'ISPA-CNR di Lecce.

Microrganismo	**Acronimo**	**Specie**	**Provenienza**
Lieviti	LI 180-7	*Saccharomyces cerevisiae*	Olive Leccino
	C 30-29	*Pichia anomala*	Olive Cellina di Nardò
Batteri lattici	L 180-11	*Lactobacillus plantarum*	Olive Leccino
	C 180-34	*Lactobacillus plantarum*	Olive Cellina di Nardò
Muffe	ITEM 16728	*Penicillium roquefortii*	Olive Leccino
	ITEM 16744	*Penicillium roquefortii*	Olive Cellina di Nardò

Tabella 1. Microrganismi provenienti da olive da tavola utilizzati in questo lavoro.

Lo studio delle interazioni tra lieviti, batteri e muffe delle due cultivar di olive da tavola Leccino e Cellina di Nardò ha previsto l'impiego di un terreno solido (Model Brine 1, MB1), la cui composizione è la seguente (Bleve et al., 2014): glucosio 3 g/l, Yeast Extract 0.5 g/l, NaCl 60 g/l, oleuropeina 500mg/l, verbascoside 360 mg/l, tirosolo 100 mg/l, acido caffeico 25 mg/l, pH 4.2. In queste condizioni è stato possibile ottenere la crescita solo dei lieviti per entrambe le cultivar di olive analizzate.

Tutte le possibili combinazioni tra i lieviti, i batteri e le muffe appartenenti a ciascuna cultivar sono state studiate depositando un inoculo pari a 0.5 µl ed 1 µl di colture pure. Nel caso dell'inoculo di 0.5 µl si è proceduto con il deposito di 3-6 gocce in linea a distanza di 3-4 mm l'una dall'altra, mentre nel caso dell'inoculo di 1 µl è stata deposta una singola goccia di coltura. Al fine di riprodurre quanto si osserva durante la fermentazione spontanea delle olive da tavola, gli inoculi effettuati contenevano la seguente quantità di cellule: per il lievito 10^3 CFU/µl, per la muffa 10^3 CFU/µl, per il batterio 10^4 CFU/µl. Dopo incubazione per 7 giorni a temperatura ambiente si è potuto constatare che le MB1 non risultano essere idonee alla crescita di muffe e batteri lattici, per cui si è cercato di modificare la composizione di questo terreno con l'introduzione di sali, micro ed oligoelementi in grado di mantenere il sistema in modo tamponato e di favorire la crescita di tali microrganismi (dati non mostrati). Dalla valutazione della composizione di terreni minerali e minimi specifici per muffe, come il Czapek medium, il Synthetic agar medium (SNA), il Basal medium e i terreni utilizzati da Pointing (1999), è stato ottimizzato il seguente terreno MB2: $NaNO_3$ 3.0 g/l, KH_2PO_4 1.0 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l, $MgSO_4$ 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, $FeSO_4$*7H2O 0.01 g/l, Yeast extract 0.5 g/l, $(NH_4)_3PO_4$ 0.3 g/l, glucosio 3 /l, NaCl 60 g/l, oleuropeina 500 mg/l, verbascoside 360 mg/l, tirosolo 100 mg/l, acido caffeico 25 mg/l, pH 4.5. Come visibile in Figura 8, quest'ultimo terreno è risultato essere permissivo per la crescita di inoculi di muffe, lieviti pari a 10^3 CFU/µl. Anche la formulazione MB2 non è risultata essere idonea per la crescita in solido dei ceppi di batteri lattici.

Per garantire la crescita dei batteri lattici, è stata ottimizzata una ulteriore formulazione di MB (MB3), aggiungendo componenti che possano essere fondamentali per assicurare la loro crescita e l'uptake dei nutrienti: $NaNO_3$ 3.0 g/l, KH_2PO_4 1.0 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l, $MgSO_4$ 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, $FeSO_4$*7H2O 0.01 g/l, Yeast extract 0.5 g/l, $(NH_4)_3PO_4$ 0.3 g/l, Tween 80 0.5 g/l, ammonio citrato 1 g/l, MnSO4 0.03 g/l, peptone 1 g/l, glucosio 3 /l, NaCl 60 g/l, oleuropeina 500mg/l, verbascoside 360 mg/l, tirosolo 100 mg/l, acido caffeico 25 mg/l, pH 4.5.

In natura durante le fermentazioni spontanee delle olive da tavola, i lieviti e batteri lattici crescono all'interno della salamoia in cui sono immerse le olive e sulla superficie si forma uno strato più o meno spesso di muffa. Per mimare questa situazione, i ceppi di lieviti, batteri per ciascuna delle due cultivar di olive sono stati inoculati in concentrazioni pari a 10^3 e 10^4 CFU/ml in MB3 liquido in sistema multiwell (Falcon), mentre le muffe, per ciascuna cultivar, sono state inoculate in concentrazioni pari a 10^3 e 10^4 CFU/µl su di un comparto (well millicell Millipore) costituito da una cella dotata al fondo di una membrana semipermeabile con pori da 1 mm di diametro e su cui viene deposto uno strato di agarosio 0.9% (w/v). Questa cella è stata immersa nel liquido contenente gli inoculi di lieviti e batteri. Durante il corso dell'esperimento, ogni giorno è stata effettuata la conta microbica di lieviti e batteri, è stata monitorata la crescita superficiale delle muffe ed è stato aggiunto l'equivalente di 0.5 ml di terreno liquido fresco a ciascun pozzetto, al fine di imitare il continuo rilascio di metaboliti dalle olive immerse nelle salamoie ad opera dell'ambiente acquoso e dell'attività metabolica dei microrganismi.

Per le olive Leccino è stato possibile osservare che lieviti e batteri sono stati in grado di crescere fino a conte > 10^7 CFU/ml. La muffa si è sviluppata in modo uniforme producendo uno strato scorificato simile a quello che si osserva durante la fermentazione spontanea delle olive. Il lievito e la muffa sono sembrati essere in grado di stimolare o perlomeno non inibire la crescita del batterio.

Per cui, da questi risultati si può dedurre che è stato modellizzato e riprodotto in piccolo il sistema di fermentazione spontanea che prevede la presenza di questi tre microrganismi (Figura 9).
Nel caso delle olive Cellina di Nardò, la muffa è sembrata essere in grado di favorire e stimolare la crescita batterica più di quanto il batterio non riesca a fare da solo, mentre il lievito C30-29, se coinoculato con il batterio lattico C 180-34 ne ha bloccato o inibito completamente la crescita. Nel caso del coinoculo lievito-batterio-muffa, la muffa non è risultata essere in grado di risolvere i problemi di inibizione/tossicità del lievito nei confronti del batterio.
Per valutare quale fosse la diluizione del terreno precedentemente trattato con il lievito C30-29 in grado di favorire la crescita del batterio C 180-34, concentrazioni decrescenti di terreno trattato con il lievito (50-10-5-1-0%) sono state inoculate con il batterio. In parallelo lo stesso esperimento è stato eseguito per la coppia lievito LI 180-7 - batterio L 180-11. A partire da un inoculo pari a 10^4 CFU/ml, è stato possibile verificare che un' aggiunta del terreno pretrattato con lievito, in entrambi i casi ha prodotto un incremento della crescita batterica, mentre aggiunte di 10-5-1 % di tale terreno producono livelli di crescita confrontabili a quelli ottenibili in mezzo di coltura fresco.

L'impiego dei sistemi modello così ottimizzati consentirà lo studio delle interazioni con approccio trascrittomico e proteomico a livello dell'espressione di specifici geni bersaglio e con approccio biochimico mediante metodi analitici per l'identificazione dei metaboliti coinvolti nella comunicazione microbica (HPLC, GC-MS).
Le attività programmate per il prossimo futruro consentiranno di mettere a punto un sistema di studio in vivo dell'interazione tra diverse specie (e regni) di microrganismi e di gettare le basi per studi di identificazione di pathway metabolici (livelli di espressione di geni e proteine) e metaboliti coinvolti nella comunicazione e dei meccanismi molecolari alla base della loro produzione ed azione.

Si può ritenere pertanto che il periodo di soggiorno effettuato dalla Dr. Bleve presso il laboratorio di Microbiologia dell'Harvard Medical School di Boston potrà essere molto utile ai fini della prosecuzione e del completamento del progetto i cui risultati saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche. Il soggiorno di ricerca ha permesso inoltre il rafforzamento della collaborazione con un gruppo di ricerca internazionale di alto livello, e soprattutto l'acquisizione di nuove competenze tecniche utili sia ad incrementare le conoscenze tecnico-scientifiche del sottoscritto, sia ad implementare future attività di ricerca per l'Istituto.

Bibliografia

Alexandre et al.2004 Int J Food Microbiol 93,141
Bojsen et al.2012 FEMS Immunol Med Micr doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00943.x.
Capucho & San Romao,1994 Appl Microbiol Biotechnol 42,391
Cecconi et al.2009 Electrophoresis 30,2988
Comitini et al.2005 J Appl Microbiol 99,105
de los Rios et al.2011 4th Congress of the Spanish Proteomics Society, 8-11 February 2011, Segovia
Di Cagno et al.2011 J Proteomics 74,19
Dick et al.1992 Vitis 31,105
Du Toit et al.2011 Food Bioprocess Tech 4,876
Eberl & Riedel 2011 Proteomics 11,3070
Edwards et al.1990 Am J Enol Viticul 41,48
Goméz-Pastor et al.2010 FEMS Yeast Research 10,870
Guilloux-Benatier & Feuillat 1993 J Int Sci Vigne Vin 27,299
Guilloux-Benatier et al.1995 Am J Enol Viticult 46,486
Guilloux-Benatier et al.1998 J Ind Microbiol Biotechnol 20,144

Hogan 2006 Eukaryotic Cell 5,613
Huang & Fraenkel 2009 Sci Signal 2,40
Hughes e Sperandio 2008 Nat Rev Microbiol 6,111
Keller & Surette 2006 Nat Rev Microbiol 4,249
Lonvaud-Funel 1999 Antonie Van Leeuwenhoek. 76: 317
Nehme et al.2010 Food Microbiol 27,150
Pai & You 2009 Mol Syst Biol 5,286
Rossignol et al.2009 J Appl Microbiol 107,47
Rossouw et al.2010 Appl Environ Microbiol 76,3911
Rossouw et al.2012 Food Microbiology 29,121
Silveira et al.2004 Appl Environ Microbiol 70,2748
Williams 2007 Microbiology 153,3923
Wuster & Babu 2008 In Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
IOOC, 2013. http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-tableolive-figures.
Brenes et al. 2004. J. Chem. Technol. Biotechnol. 79, 253-259.
Romero et al. 2004. J. Agric. Food Chem. 52, 479-484.
Panagou et al. 2008. Food Microbiol. 25, 348-358.
Arroyo-Lopez et al. 2008. Int. J. Food Microbiol. 128, 189-196.
Bevilacqua et al. (2012). Front. Food Microbiol. 3:194. doi: 10.3389/fmicb.2012.00194
Heperkan (2013). Front. Microbiol. 4:143.doi:10.3389/fmicb.2013.00143
Baffi et al. (2012) N Biotechnol. 29(3):451-6.
Bleve et al (2013) Brevetto Italiano - MI2013A002063 – Metodo per la produzione di olive da tavola fermentate.
Bleve et al. (2015). Food Microbiology, 46:368-382
Bleve et al. (2014) Frontiers in Microbiology 5:570. doi: 10.3389/fmicb.2014.00570.
Pointing 1999. Fungal Diversity 2, 17–33.

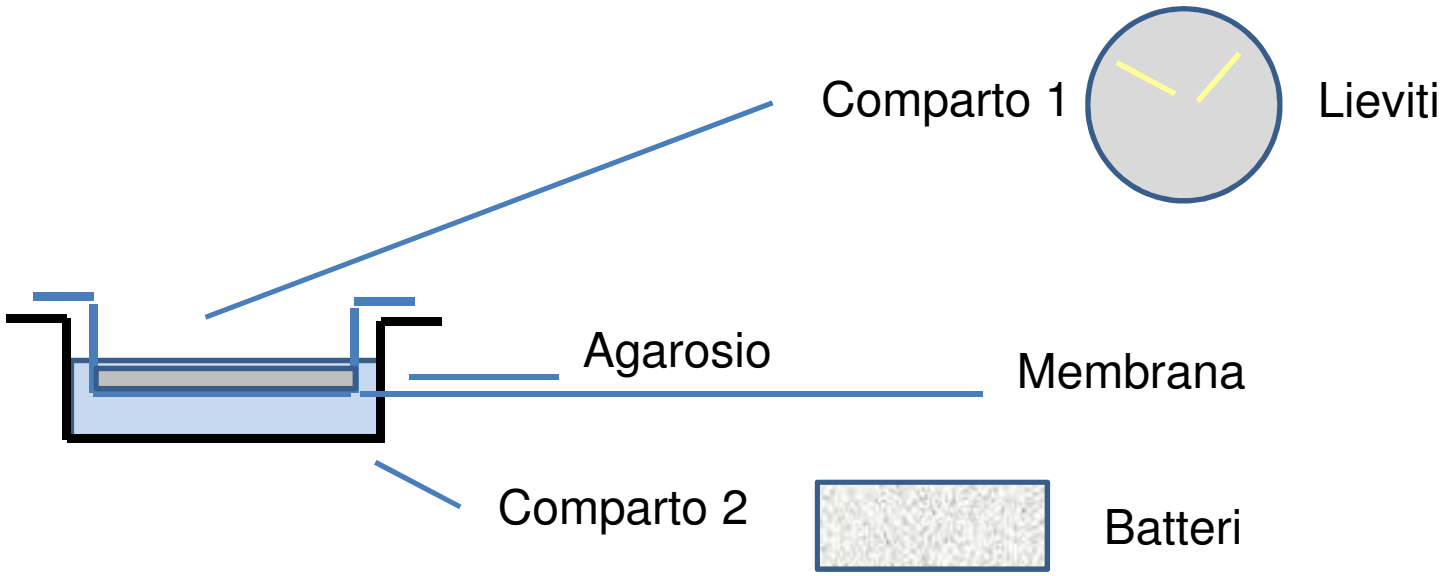


Figura 1. Sistema di studio dell'interazione tra microrganismi in co-coltura solido-liquida. Comparto 1 (solido): vaschetta contenente una membrana semipermeabile da 1 µm e su cui viene deposto uno strato di agarosio allo 0.8%. Sulla superficie dell'agarosio vengono depositati i lieviti. Comparto 2 (liquido): vaschetta contenente terreno liquido in cui vengono inoculati i batteri.

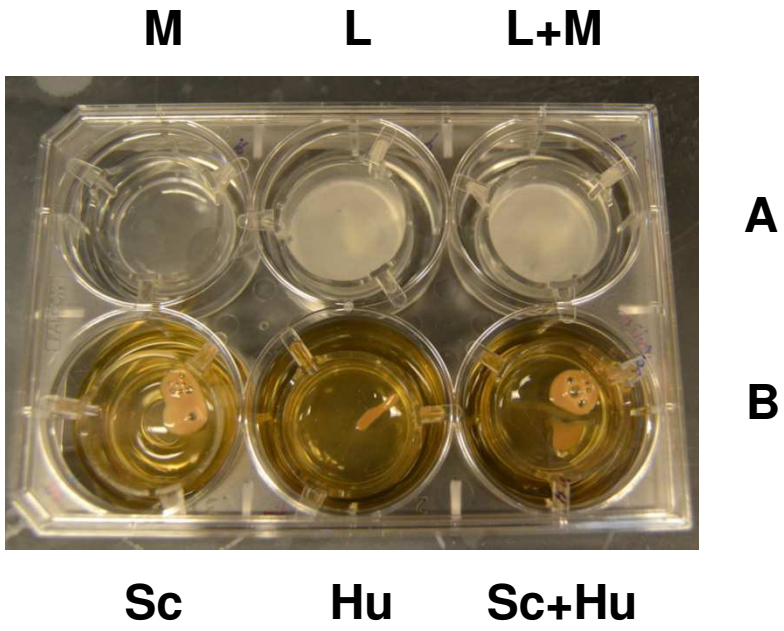


Figura 2. Sistema di studio dell'interazione tra microrganismi in co-coltura solido-liquida. M: muffa, L: lievito, L+M: Lievito+ Muffa. PannelloA Terreno liquido Model Brine 1. Sc: S. cerevisiae, Hu: H. uvarum, Sc+Hu: S. cerevisiae+ H. uvarum. Pannello B: Terreno liquido SGM.

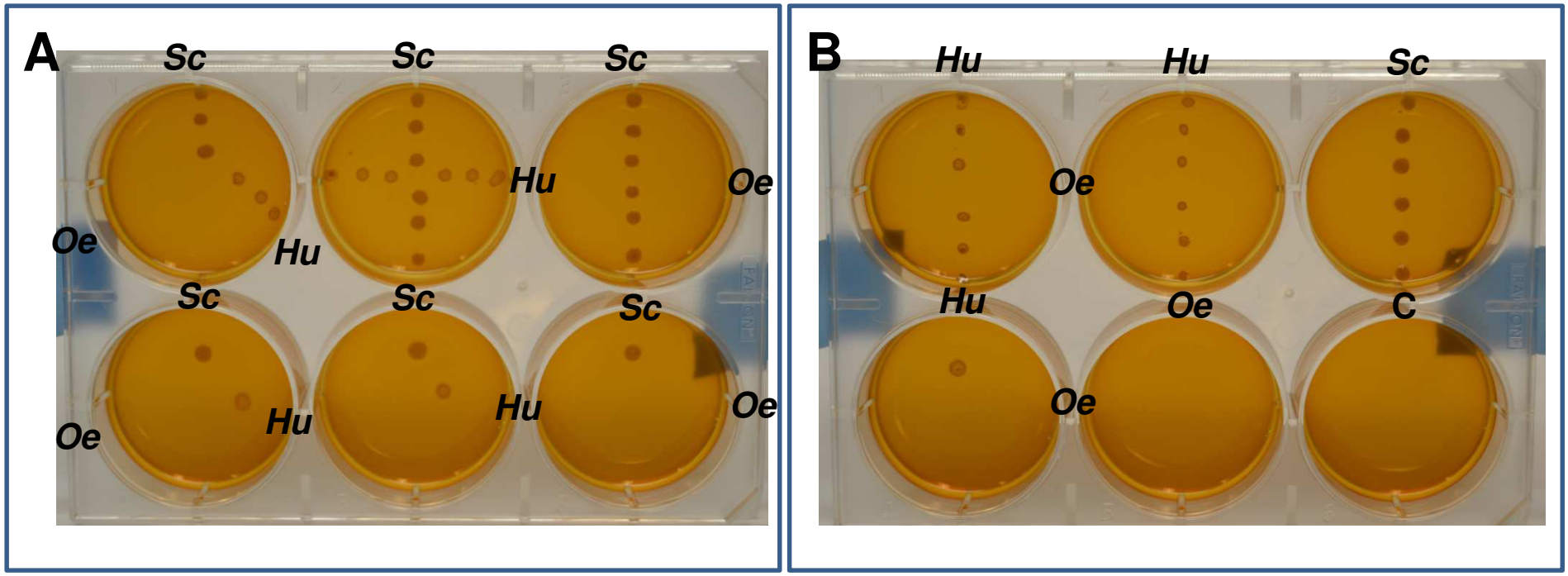


Figura 3. Studio dell'interazione tra microrganismi in SGM. Sc: S. cerevisiae, Hu: H. uvarum, Oe: O. oeni.

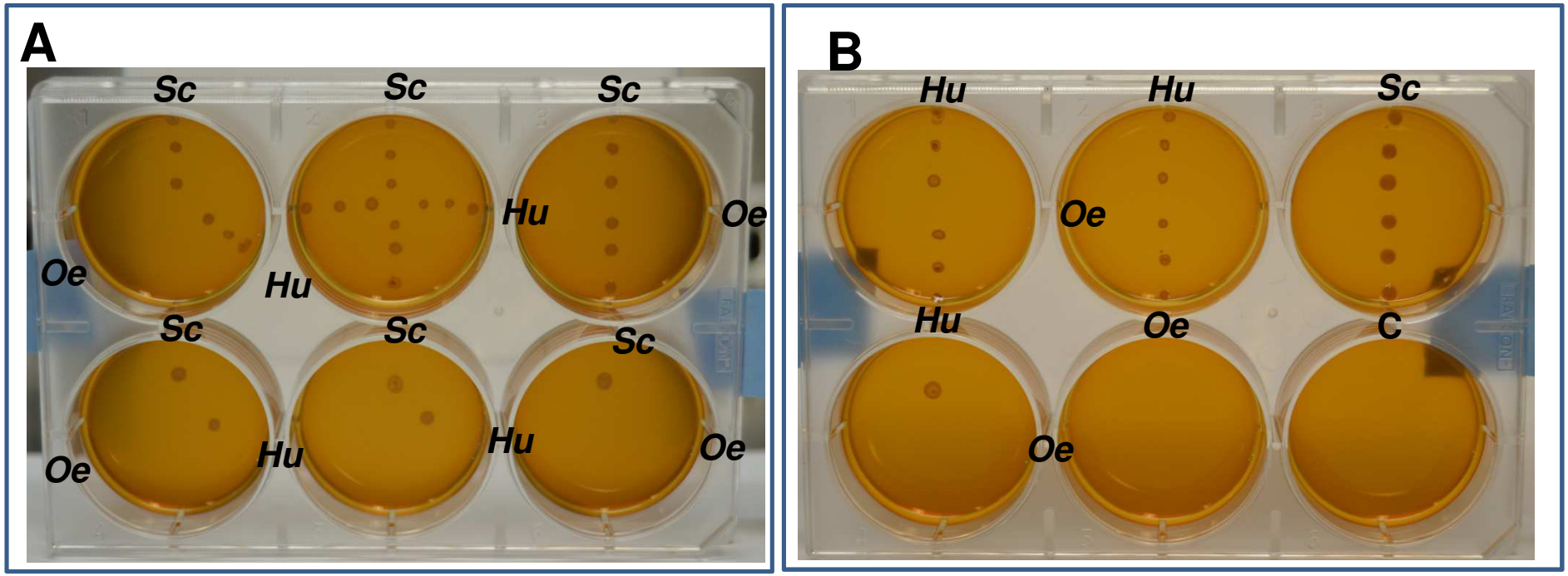


Figura 4. Studio dell'interazione tra microrganismi in SGM + 5% (v/v) di etanolo. Sc: S. cerevisiae, Hu: H. uvarum, Oe: O. oeni.

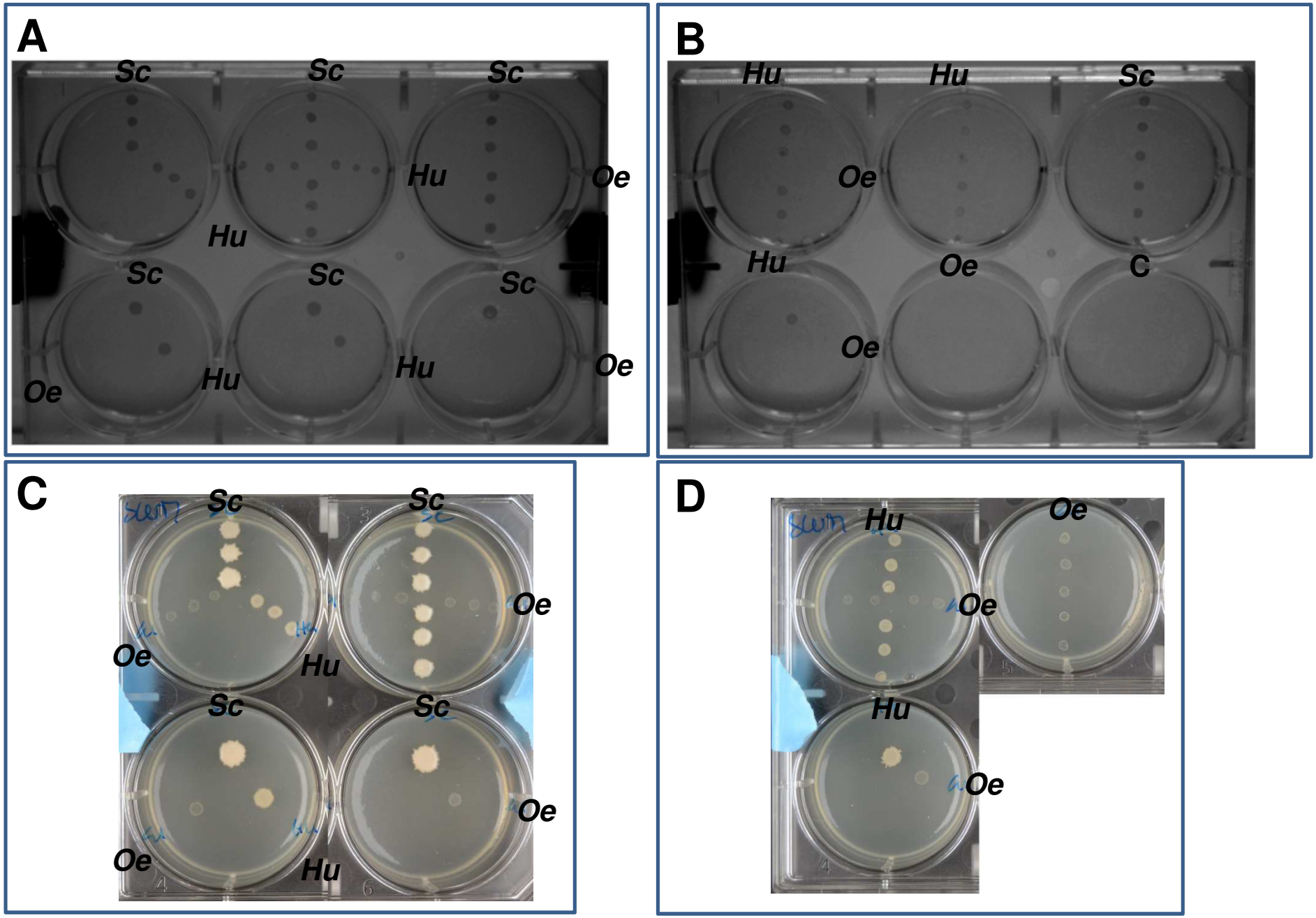
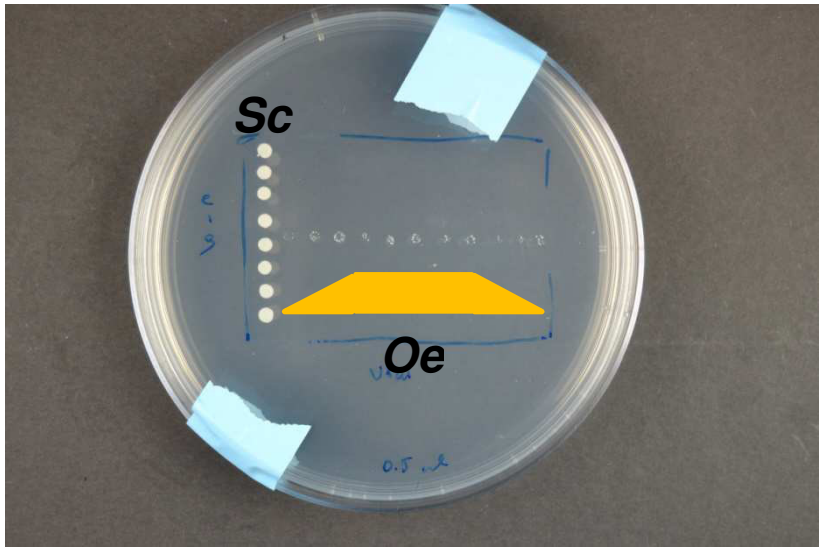


Figura 5. Studio dell'interazione tra microrganismi in SWM + 10% (v/v) di etanolo. Sc: S. cerevisiae, Hu: H. uvarum, Oe: O. oeni. Pannelli A e B: crescita dopo 7 giorni. Pannelli C e D: crescita dopo 14 giorni.

A



B

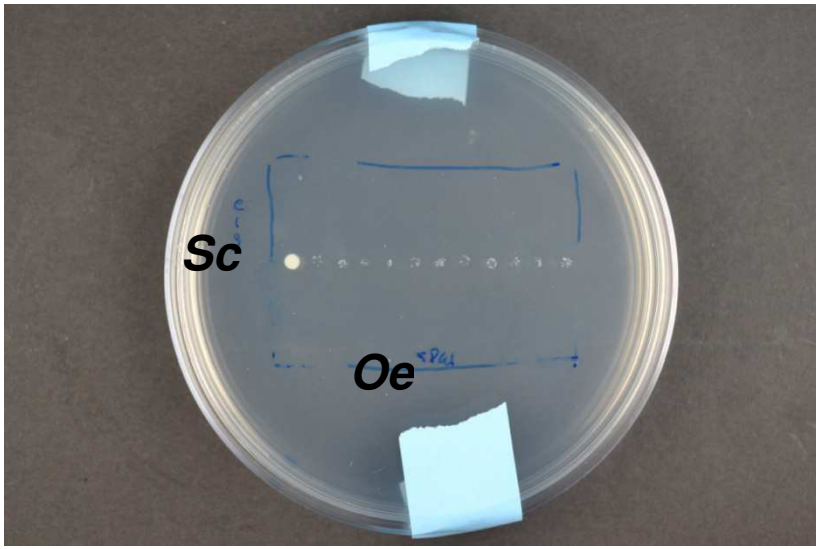


Figura 6. Studio dell'effetto di S. cerevisiae sulla crescita di O. oeni in SWM + 10% (v/v) di etanolo, secondo due differenti tipologie di deposizione dell'inoculo.

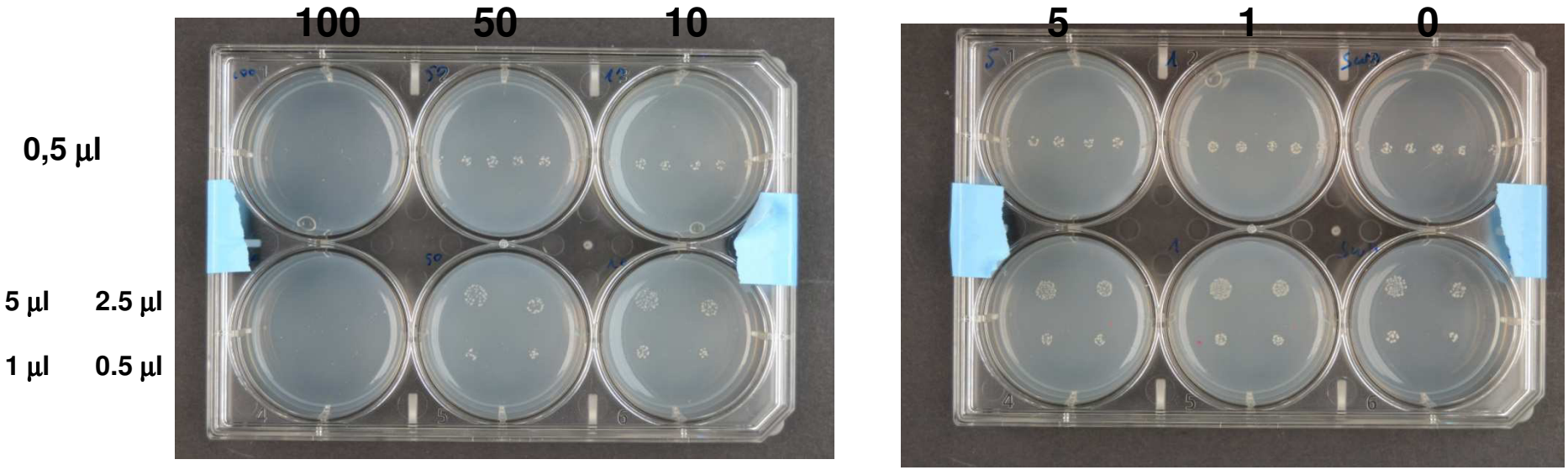


Figura 7. Studio dell'effetto dei metaboliti di S. cerevisiae sulla crescita di O. oeni in terreno SWM contenenti concentrazioni decrescenti di SWM pretrattato con S. cerevisiae, secondo due differenti tipologie di deposizione dell'inoculo.

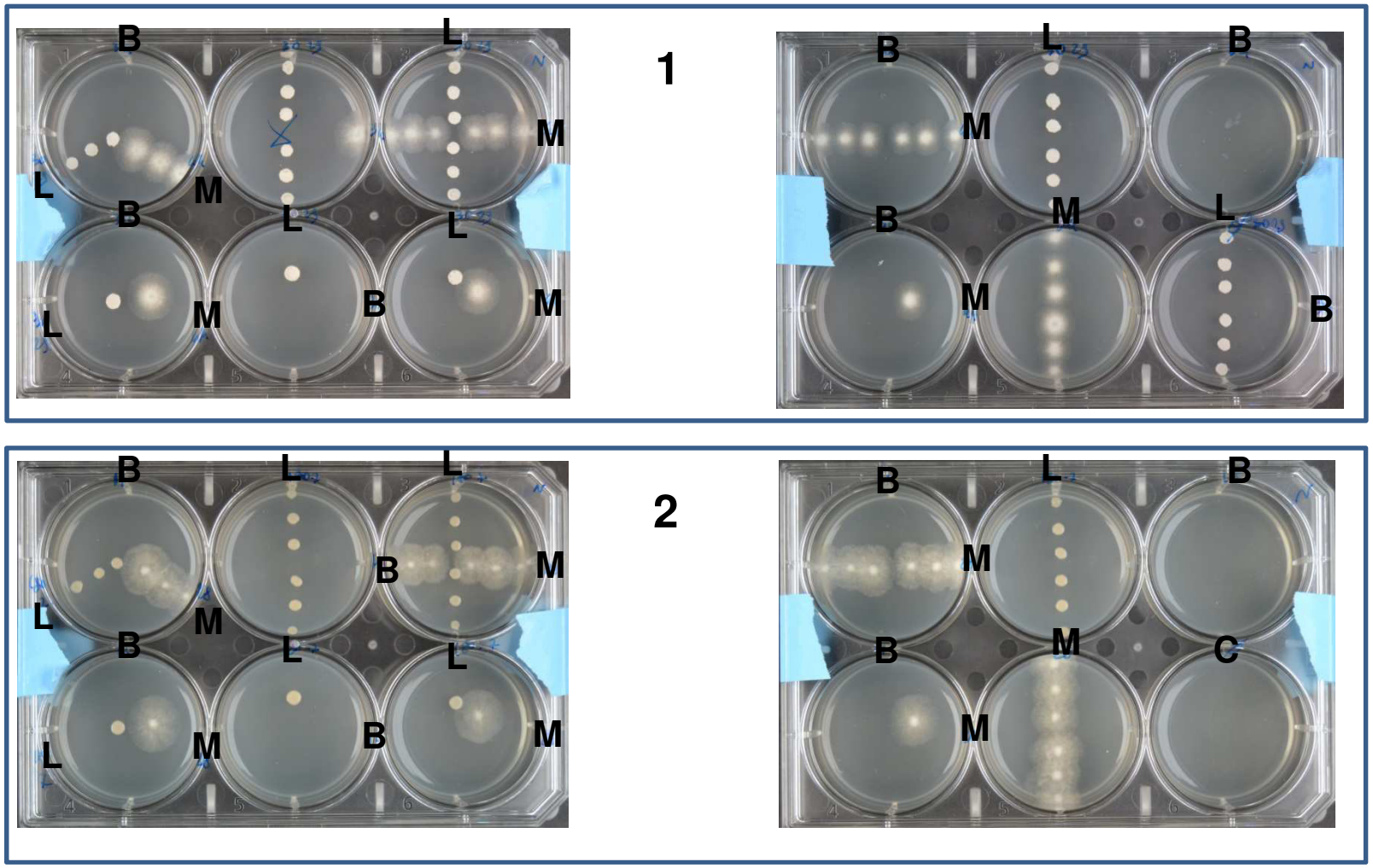


Figura 8. Studio dell'interazione tra microrganismi in MB2. Pannello 1 Cellina di Nardò. L: C 30-29, B: C 180-34, M: ITEM 16744. Pannello 2 Leccino. L: LI 180-7, B: C 180-11, M: ITEM 16728. C:controllo non inoculato.

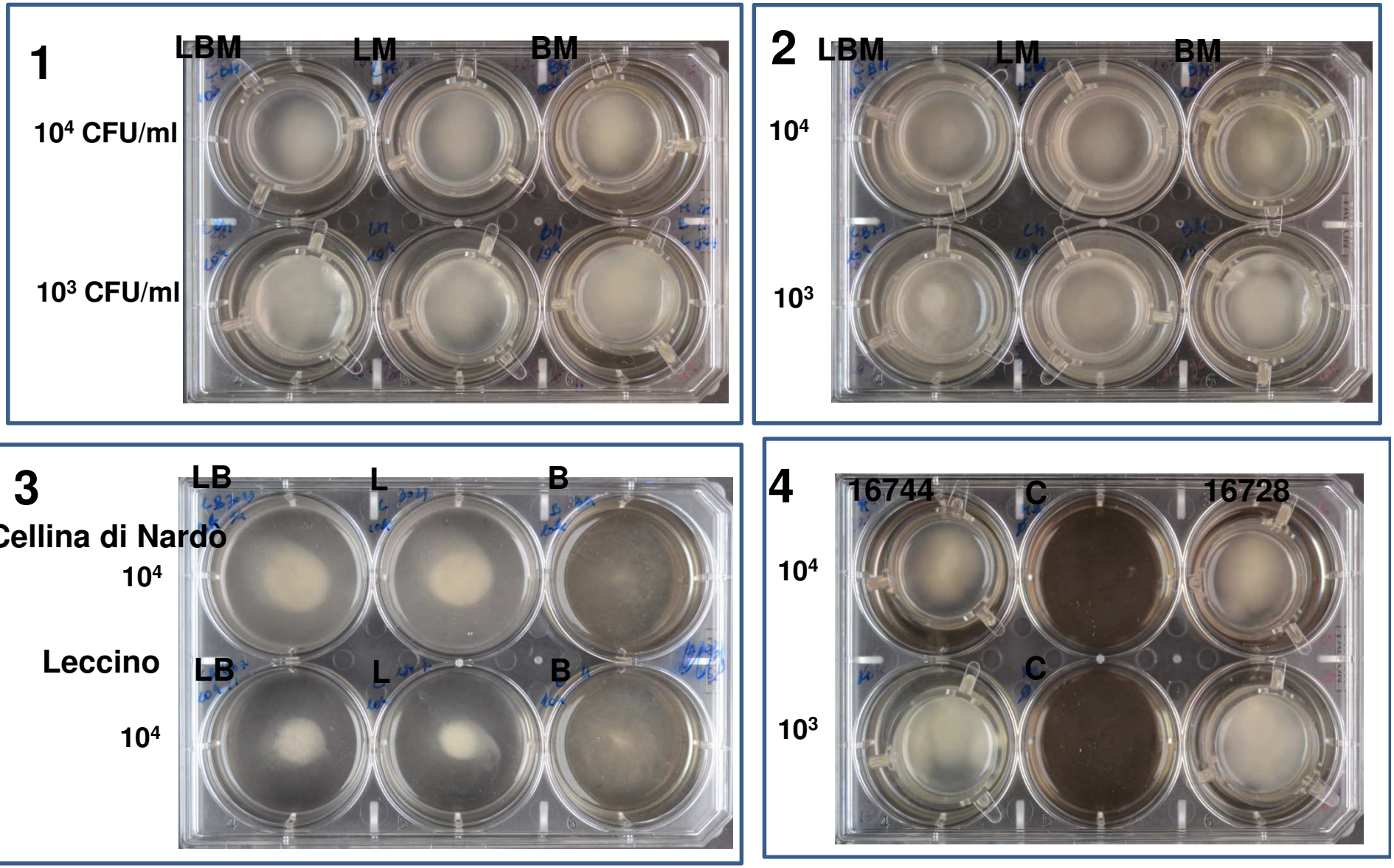


Figura 9. Studio dell'interazione tra microrganismi in MB3. Pannello 1. Leccino L: LI 180-7, B: C 180-11, M: ITEM 16728. Pannello 2. Cellina di Nardò L: C 30-29, B: C 180-34, M: ITEM 16744. Pannello 3. Pozzetti superiori Cellina di Nardò L: C30-29, B: C 180-34. Pozzetti inferiori. Leccino L: LI 180-7, B: L 180-11. Pannello 4. Inoculo muffe ITEM 16744 e Item 18728. C:controllo non inoculato.