

**6.7 LINEA B3 - IL CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA  
PER LA TUTELA DELLA QUALITÀ DEL VINO**

**Coordinatore scientifico: Prof.ssa Lisa Granchi – DIBA Sezione  
Microbiologia - Università di Firenze**

**AUTORE DEL DOCUMENTO**

**Prof.ssa Lisa Granchi - DIBA Dipartimento di Biotecnologie Agrarie  
Sezione Microbiologia - Università di Firenze  
Piazzale delle Cascine, N. 24**

## **1) Stato dell'arte**

### *Fermentazione malolattica e suo significato enologico*

La fermentazione malolattica (FML), termine tradizionalmente usato per definire la conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico ed anidride carbonica operata in vino da alcune specie di batteri lattici, ha progressivamente perduto importanza come pura e semplice reazione disacidificante per assumere un significato enologicamente più complesso. In effetti, alla FML è oggi attribuita un'azione decisiva nel conferire al vino una maggiore complessità di gusto e di aroma attraverso modificazioni di componenti non solo di origine fermentativa, ma anche di origine vegetale-varietale, con effetti accattivanti sul profilo sensoriale del prodotto finito e, quindi, apprezzati dal mercato che tende a preferire vini con gusto morbido e dall'aroma intenso e complesso, con note sensoriali possibilmente tipiche della zona di origine (Kunkee, 1991; Henick-Kling, 1993; Lonvaud-Funel, 1999). Questi aspetti hanno reso la FML particolarmente desiderata e sempre più ricercata. Tuttavia, per le caratteristiche chimico-fisiche del vino, fortemente sfavorevoli allo sviluppo dei batteri lattici, la FML ha un carattere capriccioso, con avvio, decorso ed esiti incerti e imprevedibili. La FML, quindi, dipende strettamente dallo sviluppo dei batteri lattici e dall'utilizzazione, oltre all'acido malico, di tutti i substrati necessari per le loro funzioni vitali che portano alla formazione dei diversi metaboliti che modificano sensibilmente la composizione chimica del vino. Tali modificazioni potranno influenzare positivamente o negativamente la qualità complessiva del vino. A determinare l'esito finale in vino concorrono in ogni modo molteplici fattori tra loro interattivi, quali la tipologia delle uve e il loro stato sanitario, la tecnica e le condizioni di vinificazione, i ceppi batterici intervenuti e la loro persistenza ed infine le possibili interazioni dei batteri lattici con altri microrganismi tra cui, in primo luogo, i lieviti. Alla fermentazione malolattica in vino sono associati tradizionalmente tre effetti: la riduzione dell'acidità, le modificazioni delle proprietà organolettiche e l'aumento della stabilità microbiologica, ma, nel corso del tempo, altri effetti si stanno prospettando, alcuni dei quali da mettere in relazione più con la salute del consumatore che con la qualità organolettica del vino.

La riduzione dell'acidità in vino è la diretta conseguenza della conversione di un acido diprotico, l'acido L-malico, in un acido monoprotico, l'acido L-lattico, da cui discende anche il conferimento al vino di un gusto più morbido e "vellutato", esaltato dalla sostituzione dell'anione malico, di sapore aspro, con l'anione lattico, molto più dolce. Conseguentemente, si registra un aumento dei valori di pH del vino di 0,3-0,5 unità. La disacidificazione può essere più o meno desiderata a seconda dell'acidità delle uve e del pH iniziale del mosto. Vini prodotti da uve coltivate in zone fredde, con un minor grado di maturazione, hanno in genere un contenuto di acido malico troppo elevato dal punto di vista organolettico e quindi una sua degradazione è auspicabile. Tuttavia, la bassa temperatura è un fattore che tende ad inibire l'avvio della fermentazione malolattica, per cui proprio laddove sarebbe più necessaria si verifica con maggiore difficoltà, a meno che non si intervenga aumentando la temperatura in cantina. Per contro, vini ottenuti in zone temperato-calde hanno tendenzialmente un minor contenuto di acido malico e non necessitano di una disacidificazione, ma frequentemente la fermentazione malolattica viene comunque ricercata per le modificazioni organolettiche che è in grado di conferire al vino e che sono ritenute responsabili di aroma e gusto più complessi. Le modificazioni organolettiche attribuibili alla FML sono a carico del colore, dell'aroma e del gusto e possono assumere connotati positivi o negativi a seconda della loro intensità e combinazione. Tuttavia, è opportuno sottolineare che tali modificazioni dipendono strettamente dalle capacità metaboliche dei singoli ceppi batterici responsabili della FML, e quindi soprattutto dalle proprietà ceppo-specifiche di *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente associata a tale processo. Come evidenziato da numerosi studi, essa presenta una considerevole eterogeneità intraspecifica, ovvero ceppi diversi sono in grado di esprimere proprietà fisiologiche e metaboliche diverse che possono riflettersi in modo più o meno positivo, se non negativo, sulla qualità del vino. Comunque, non sempre è possibile attribuire l'origine di particolari sapori od odori a specifici componenti o a specifiche attività metaboliche dei ceppi batterici. Per quanto riguarda l'aroma si ritiene che la FML tenda a ridurre il carattere "erbaceo" e ad aumentare le note "fruttate", ma non è un'opinione generalmente accettata per il fatto che non sono stati ancora individuati con certezza i composti responsabili

di queste proprietà organolettiche. Senza dubbio, invece, contribuiscono a modificare l'aroma composti che derivano dalla degradazione dell'acido citrico (spesso associata alla degradazione del malico), come l'acido acetico e i composti acetoinici. Tra questi, il più importante da un punto di vista sensoriale è certamente il diacetile, che grazie alla sua bassa soglia percettiva (12-14 mg/L per i vini rossi), è responsabile dell'aroma di "burro" nei vini, e i suoi valori soglia di desiderabilità variano a seconda del vino preso in considerazione. Un ruolo minore nella definizione aromatica del vino è svolto dall'acetoino, la cui soglia di percezione è molto elevata rispetto alle concentrazioni in cui di solito si presenta. Il 2,3-butandiolo invece, a concentrazioni intorno a 570 mg/L (Sponholz *et al.*, 1993), esercita la sua azione non tanto sul bouquet, quanto sul corpo del vino provocando un incremento di viscosità e quindi un aumento del corpo stesso. Altri composti prodotti occasionalmente dai batteri lattici in quantità tali da influenzare le proprietà sensoriali di un vino comprendono l'acetaldeide e gli esteri, acetato di etile e lattato di etile. Alcune specie di lattobacilli (*L. brevis* e *L. plantarum*) sono capaci di convertire gli acidi ferulico e *p*-cumarico nei rispettivi fenoli volatili, 4-etilguaiacolo e 4-etilfenolo responsabili di anomalie aromatiche.

Per molto tempo è stato ritenuto che il consumo dell'acido malico in seguito alla fermentazione malolattica e la degradazione dell'acido citrico avessero come conseguenza una maggiore stabilità microbiologica del vino finito, ovvero una minore probabilità di sviluppo microbico indesiderato. Analogamente, veniva data una valenza positiva al consumo, sempre da parte dei batteri lattici, di altri composti come aminoacidi e vitamine, dal momento che era considerato un ulteriore esaurimento di substrati potenzialmente utilizzabili da altri microrganismi indesiderati. Alla luce delle attuali conoscenze, questa risulta un'interpretazione generalizzata e semplicistica delle complesse situazioni che si possono verificare in vino e che non necessariamente conducono ad una stabilità biologica. In effetti, per poter interpretare il contributo dato dai batteri lattici alla stabilità microbiologica, per prima cosa, è indispensabile conoscere le proprietà delle specie batteriche o dei ceppi che hanno condotto la fermentazione malolattica e le condizioni ambientali. Inoltre, la degradazione dei suddetti substrati, in modo particolare i composti azotati, può portare anche alla

formazione di composti dotati di proprietà negative per la salute del consumatore di vino. Recentemente, infatti, sono state evidenziate alcune proprietà metaboliche di ceppi di *O. oeni* il cui effetto non è tanto da mettere in relazione con la qualità organolettica del vino, quanto con la salute del consumatore. In particolare, è stato dimostrato che, contrariamente a quanto ritenuto in precedenza, *O. oeni* è in grado di degradare arginina, uno degli aminoacidi maggiormente presenti in mosto ed in vino, con conseguente liberazione di prodotti intermedi (citrullina e carbamilfosfato) che possono reagire spontaneamente con l'etanolo formando etilcarbammato, un composto dotato di attività cancerogena. Inoltre, in seguito alla decarbossilazione dell'ornitina, altro intermedio metabolico dell'arginina, o alla decarbossilazione di altri aminoacidi, quali istidina, lisina e tirosina, diversi ceppi di *O. oeni* si sono dimostrati capaci di formare in vino le corrispondenti amine biogene (AB) putrescina, istamina, cadaverina e tirosina.

#### *Ruolo dei batteri lattici nella produzione di amine biogene*

Le AB sono basi organiche a basso peso molecolare che possono essere presenti in diversi alimenti in seguito alla decarbossilazione microbica degli aminoacidi corrispondenti (Ten Brink et al., 1990) e che sono ritenute responsabili di vari effetti tossici nell'uomo, la cui gravità varia in funzione della concentrazione delle singole ammine e della sensibilità individuale (Silla Santos, 1996). Diverse AB, quali istamina, putrescina, cadaverina e tiramina, in quantità variabili da pochi mg a diverse decine di mg/L, sono state riscontrate anche in vino, e più frequentemente nei vini rossi (Gloria et al., 1998), destando una certa preoccupazione per la salute del consumatore. Al momento, non esiste una regola generale che giustifichi la presenza o l'evoluzione delle AB in questo ambiente, anche se tenori elevati di amine non volatili sono stati spesso correlati con lo sviluppo di batteri lattici ed il compimento della FML (Vidal-Carou et al., 1990, Buteau et al., 1984). In effetti, diverse specie batteriche, inclusi anche alcuni batteri malolattici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus*, sono risultate capaci di formare AB. In ogni caso, tenori elevati di AB sono in genere ritenuti un indice di scarsa attenzione prestata alle norme igieniche durante le

varie fasi della produzione vinaria. Recentemente, però, anche alcuni ceppi appartenenti alla specie *O. oeni*, generalmente ritenuta "sicura" agli effetti delle caratteristiche organolettiche del prodotto finale e della salute del consumatore, sono risultati capaci di produrre istamina, cadaverina e putrescina, l'amina presente in vino con la maggiore frequenza e la maggiore concentrazione, (Lonvaud-Funel e Joyeux , 1994; Guerrini et al., 2002). A tale riguardo, da una recente indagine condotta su diversi ceppi vinari di *O. oeni* (Guerrini et al., 2002), è emerso che la capacità amino-produttiva è quali-quantitativamente assai variabile tra ceppi diversi: in condizioni di coltura ottimali, infatti, il 60% dei 42 ceppi saggiati in questo studio è risultato capace di produrre istamina, in quantità variabili in funzione del ceppo. Sette dei ceppi che si sono dimostrati produttori di istamina, sono risultati capaci di produrre anche putrescina e cadaverina, mentre i ceppi incapaci di produrre istamina non si sono dimostrati capaci di produrre neppure putrescina o cadaverina. Quindi, la capacità di produrre putrescina e cadaverina sembrerebbe, all'interno della specie *O. oeni*, assai meno diffusa della capacità istamino-produttiva, ma certamente non meno importante per entità di produzione e per possibili conseguenze pratiche. La putrescina, infatti, oltre ad essere il principale potenziatore delle attività tossiche dell'istamina, risulta essere anche l'AB più frequentemente riscontrata in vino. Per approfondire le dinamiche della formazione delle AB in vino, uno recente studio (Mangani, *in stampa*) è stato condotto monitorando il rilascio di queste sostanze e le popolazioni microbiche nel corso di quattro vinificazioni in condizioni reali di cantina. I risultati ottenuti hanno chiaramente evidenziato come la FML sia effettivamente il momento critico per la produzione di AB durante la vinificazione, sottolineando il ruolo centrale svolto in questo fenomeno da *O. oeni*. E' chiaro che l'argomento meriterebbe ulteriori approfondimenti, anche in considerazione del fatto che, malgrado non esista ancora alcuna imposizione di legge nazionale o comunitaria che fissi valori massimi di AB nei vini, diversi Paesi europei hanno manifestato attenzione per il problema raccomandando valori massimi ammissibili di istamina pari a 2-10 mg/L, a seconda del Paese: Germania, 2 mg/L; Olanda, 3,5 mg/L; Finlandia, 5 mg/L; Belgio, 6 mg/L; Francia, 8 mg/L; Svizzera, 10 mg/L (Busto, 1996). Alla luce di quanto sopra riportato, diventa chiara la necessità di sviluppare

strumenti diagnostici rapidi che permettano il riconoscimento dei ceppi di *O. oeni* capaci di decarbossilare gli aminoacidi precursori delle AB, prima che questi prendano il sopravvento compromettendo inesorabilmente la qualità igienica del vino. Tra le diverse metodiche disponibili quelle molecolari, ed in particolare la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR), risponde a tale requisito ed è stata applicata ai fini diagnostici in diversi alimenti. Relativamente ad *O. oeni*, ad oggi sono disponibili solo i primer specie specifici per il gene *hdc* che codifica per l'istidina decarbossilasi (Coton et al., 1998) e la sequenza del gene *odc* che codifica per l'ornitina decarbossilasi di (Marcobal et al., 2004; Granchi et al., 2005). La validazione dei primer esistenti per l'*hdc* e la costruzione di primers anche per il gene *odc* dovrebbe essere il primo passo indispensabile per la messa a punto di una metodica rapida da utilizzare direttamente in vino. Tali strumenti renderebbero possibile da un lato, il monitoraggio dei ceppi batterici dotati di proprietà negative naturalmente presenti in vino, in modo da intervenire tempestivamente per ridurre o limitare la formazione di AB, e dall'altro permetterebbero la selezione di ceppi batterici da impiegare come starter malolattici che siano incapaci di formare questi composti indesiderati. In effetti, dovrebbe essere possibile limitare la formazione di AB selezionando adeguati ceppi batterici da impiegare come colture starter per indurre la fermentazione malolattica, ma occorre considerare che, anche in questo caso, sarà difficilmente prevedibile il comportamento della popolazione batterica naturalmente presente. L'uso dello starter, infatti, anche nel caso riesca a condurre con successo la FML, non garantisce che la microflora naturalmente presente in vino non rilasci AB, pertanto diventa necessario un attento monitoraggio della popolazione microbica presente e, nel caso, l'eliminazione della popolazione subito dopo il completamento della degradazione dell'acido malico mediante metodi chimici (impiego di dosi appropriate di anidride solforosa o lisozima) o fisici (filtrazione). E' stato, infatti, dimostrato come la produzione da parte di *O. oeni* di putrescina da arginina, l'aminoacido presente in mosto a concentrazioni maggiori, avvenga solo dopo l'esaurimento dell'acido malico (Mangani et al., 2005).

In definitiva, quanto esposto mette in evidenza come, nonostante le numerose ricerche, la FML risulti ancora oggi una fase della vinificazione difficile da controllare non solo per quanto riguarda l'avvio e il decorso del processo fermentativo che sono correlati alla sopravvivenza cellulare dei batteri, ma anche per gli effetti legati all'attività metabolica dei singoli ceppi batterici coinvolti.

Da sottolineare, che la ricerca è stata finora finalizzata principalmente allo studio degli effetti sul vino dei vari ceppi di batteri malolattici, mentre scarsa attenzione è stata rivolta ai meccanismi che inducono le cellule batteriche a produrre certi metaboliti o ad avere un determinato comportamento. Un approccio che preveda l'indagine sul significato biologico delle diverse proprietà metaboliche e fisiologiche dei batteri malolattici potrebbe portare alla spiegazione dei fenomeni riscontrati in vino, contribuendo in modo sostanziale alla comprensione delle problematiche non ancora risolte riguardanti il controllo della FML.

## **2) Obiettivi del programma di ricerca**

Il presente progetto è finalizzato alla messa a punto di strategie di controllo della FML in modo da contribuire alla tutela della qualità del vino, intendendo per qualità non solo il raggiungimento di un prodotto con le caratteristiche organolettiche desiderate, ma anche e soprattutto un prodotto sicuro da un punto di vista igienico. Alla luce delle più recenti ricerche, appare estremamente importante lo sviluppo di strumenti diagnostici che permettano il riconoscimento dei ceppi di *O. oeni* dotati della capacità decarbossilasica a carico di aminoacidi precursori di amine biogene. Tali strumenti renderebbero possibile da un lato la selezione di ceppi batterici incapaci di formare AB da impiegare come colture starter per indurre la fermentazione malolattica e, dall'altro, il monitoraggio dei ceppi batterici naturalmente presenti in vino in modo da intervenire tempestivamente per ridurre o comunque limitare la formazione di questi composti indesiderati.

In particolare, il presente progetto si propone i seguenti obiettivi:

### **B.3a: Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina**

Il primo obiettivo sarà quello di ottenere una metodica rapida che consenta l'individuazione in vino di batteri appartenenti alla specie *O. oeni* con attività decarbossilasica ed, in particolare, potenzialmente capaci di produrre istamina, l'amina che manifesta la maggior tossicità per l'uomo, e la putrescina, l'amina che trovata in elevate quantità in vino più efficacemente potenzia l'effetto tossico dell'istamina. Tale capacità in effetti, non è una caratteristica dell'intera specie ma è limitata a quei ceppi che recano i geni codificanti le aminoacido decarbossilasi mentre altri non mostrano l'espressione di enzimi decarbossilanti attivi. La metodica prevede l'impiego della tecnica della PCR (polymerase chain reaction) sul DNA estratto direttamente dal vino e l'uso di primer specifici che consentano di ottenere l'individuazione rapida e precoce dei geni *hdc* e *odc*. Ciò dovrebbe consentire di disporre di uno strumento utile al fine di prevenire e/o limitare la formazione di istamina e putrescina durante le varie fasi della vinificazione.

### **B.3b: Sviluppo di un metodo in Real-Time PCR per la quantificazione della popolazione di *O. oeni* capace di produrre istamina e putrescina**

Il secondo obiettivo consiste nell'ottenimento di un protocollo in Real-Time PCR (Q-PCR) per la determinazione quantitativa della popolazione di *O. oeni* produttrice di istamina e putrescina rispetto alla popolazione totale della stessa specie presente in un vino. Questa tecnica, rispetto alla PCR nella configurazione tradizionale, permette di ottenere dati quantitativi, ovvero permette di conoscere in tempi rapidi l'entità sia della popolazione totale di *O. oeni* che di quella capace di produrre AB. Come è noto, il numero delle cellule batteriche presenti in un vino è determinante per prevedere o monitorare l'andamento della FML, ma con i tradizionali metodi colturali i tempi necessari per ottenere un

dato quantitativo sono di circa 7-10 giorni, data la lenta crescita di *O. oeni*. La possibilità di quantificare in tempi rapidi la popolazione di *O. oeni* rappresenta quindi uno strumento estremamente utile per un migliore controllo del processo fermentativo.

**B.3c: Definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che influenzano la formazione di amine biogene in vino da parte di *O. oeni***

Il terzo obiettivo è la definizione delle condizioni ambientali e/o dei parametri nutrizionali che limitano o favoriscono il rilascio di AB in vino da parte di *O. oeni*. Conoscere le condizioni ambientali che influenzano la produzione di AB da parte della specie microbica maggiormente responsabile dell'accumulo di queste sostanze in vino dovrebbe consentire da un lato di pianificare gli interventi possibili per limitare il problema e allo stesso tempo individuare le situazioni a rischio che possono compromettere lo stato igienico del prodotto finito.

Per comprendere le dinamiche dalla formazione di AB in vino verranno presi in considerazione gli effetti interattivi di alcune variabili sull'attività decarbossilasica di *O. oeni*. Le variabili scelte saranno la concentrazione degli aminoacidi precursori delle AB e dell'acido malico, il pH e l'etanolo, per la loro influenza sulla attività cellulare, il fruttosio e i pentosi, che spesso sono l'unica fonte di carbonio disponibile per i batteri malolattici al termine della fermentazione alcolica.

Particolare attenzione sarà rivolta alla produzione di putrescina da parte di ceppi di *O. oeni* dotati di un diverso corredo enzimatico. Infatti, la putrescina può essere formata direttamente da ornitina da parte di ceppi dotati di attività ornitina-decarbossilasica oppure da arginina da parte di ceppi dotati della via degradativa arginina deiminasi (ADI) e dell'attività decarbossilasica a carico dell'ornitina (prodotto intermedio della via ADI).

**3) Piano di attività**

**B.3a: Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina.**

Questa fase della ricerca si propone di mettere a punto una metodica molecolare che consenta la rapida individuazione di ceppi di *O. oeni* capaci di produrre istamina e putrescina attraverso le seguenti fasi intermedie:

**B.3a.1** Disegno di primer specifici per i geni *hdc* e *odc* e messa a punto del protocollo di amplificazione PCR

In questa fase verranno presi in considerazione 20 ceppi di *O. oeni* appartenenti alla collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze (DiBA) isolati da vini prodotti in diverse zone enografiche italiane (Guerrini et al., 2003) e risultati, nel corso di una precedente indagine, in possesso di una diversa capacità di produrre AB (Guerrini et al., 2002).: Ceppi non produttori di AB verranno utilizzati come controllo. Mediante tecniche di PCR saranno individuati i geni che codificano l'istidina decarbossilasi (HDC) e l'ornitina decarbossilasi (ODC), ovvero gli enzimi responsabili rispettivamente della formazione di istamina e putrescina. Per l'amplificazione del gene *hdc*, mediante la tecnica della PCR, saranno validati i primer specifici già disponibili in letteratura (Coton et al., 1998). Nel caso di risultato negativo verrà adottata una differente strategia che prevede il sequenziamento dei geni codificanti l'ODC nei ceppi oggetto di studio. Per l'amplificazione del gene *odc* saranno sviluppati primer specifici sulla base di una porzione del gene recentemente sequenziata (Granchi et al., 2005) e sarà messo a punto e standardizzato un protocollo di amplificazione mediante PCR.

**B.3a.2** Validazione dei protocolli di PCR

Una volta individuati i primer che consentano di amplificare i geni *hdc* e *odc*, verrà verificata la loro specificità per *O. oeni* considerando isolati batterici appartenenti ad altre specie di origine vinaria (*Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*) che possiedono attività decarbossilasica e non. Inoltre, al fine di escludere una possibile interferenza dei lieviti con la specificità della reazione di amplificazione, i primers saranno testati utilizzando colture miste di *Saccharomyces*

*cerevisiae* e ceppi di *O. oeni* produttori di AB. Successivamente, l'efficacia dei protocolli ottimizzati verrà saggiata su 100 isolati di *O. oeni* appartenenti alla collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze (DiBA) che saranno contemporaneamente caratterizzati per la loro capacità di produrre istamina e putrescina. Ciò dovrebbe consentire di valutare se effettivamente l'amplificazione coincida sempre con una capacità decarbossilasica rilevabile mediante analisi HPLC delle AB formate secondo il metodo riportato da Guerrini et al., 2002.

### **B.3a.3** Sviluppo e validazione di un protocollo di estrazione di DNA da vino e amplificazione dei geni *hdc* e *odc*

E' noto **che** la presenza di varie sostanze del vino, quali ad esempio i polifenoli, possano interferire con la di PCR diminuendone l'efficacia nell'amplificazione del DNA estratto da questa matrice. Per poter quindi compiere direttamente sul DNA estratto da vino la PCR con i primer individuati nella precedente sperimentazione verrà messo a punto un protocollo idoneo che consenta l'eliminazione delle sostanze che interferiscono con la reazione diminuendo in maniera rilevante l'efficienza dell'amplificazione. Per l'estrazione del DNA di *O. oeni* da campioni di vino naturale si propone di valutare due metodologie. La prima prevede una centrifugazione del campione, lavaggio della pellet e trattamento con polivinilpirrolidone per rimuovere i polifenoli. La seconda intende valutare alcuni kit di estrazione del DNA già impiegati per l'analisi molecolare di batteri anche in alimenti o altre matrici. Per valutare l'applicabilità del protocollo verrà effettuata l'amplificazione dei geni *hdc* e *odc* partendo direttamente sia da campioni di vino inoculato con gli stessi ceppi batterici che avevano mostrato amplificazione nelle precedente sperimentazione che da campioni di vino ai quali è stato aggiunto il DNA batterico estratto in modo da valutarne il recupero.

**B.3a.4** Applicazione dei protocolli di PCR nel corso di FML su scala pilota

Infine i metodi sviluppati saranno validati direttamente in vino nel corso di fermentazioni malolattiche condotte su scala pilota (verranno analizzate 3 delle vinificazioni sperimentali provenienti dalla ricerca B.2). I campioni verranno prelevati in corrispondenza di una evidente degradazione dell'acido malico nel corso del processo fermentativo e per ciascuno di essi verrà condotta l'analisi HPLC per rilevare l'eventuale presenza di AB mentre parallelamente verranno sottoposti a analisi PCR utilizzando i primers per l'*odc* e l'*hdc*. I campioni verranno anche sottoposti a conta vitale su piastra in un mezzo selettivo per *O. oeni* (MRS pH4,8 integrato con pimaricina, un inibitore dei lieviti) e un numero significativo di colonie verranno purificate, identificate mediante analisi PCR del gene che codifica per l'enzima malolattico (Zapparoli et al., 1998) ed infine verranno saggiate per valutare le loro capacità a produrre o a non produrre AB in un mezzo sintetico specifico. Controlli incrociati di questo tipo dovrebbero garantire la possibilità di validare effettivamente il metodo in condizioni reali.

**B.3b: Sviluppo di un metodo in Real Time PCR (Q-PCR) per la quantificazione della popolazione di *O. oeni* capace di produrre istamina e putrescina**

Questa fase della ricerca si propone di mettere a punto, mediante la tecnica della Q-PCR che si basa sull'impiego di sonde nucleotidiche dotate di marcatori fluorescenti, un metodo che consenta la rapida quantificazione della popolazione di *O. oeni* capace di produrre istamina e putrescina rispetto ad una popolazione totale della stessa specie. Sono previste le seguenti fasi intermedie.

**B.3b.1** Determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino mediante Q-PCR

Allo scopo di quantificare la presenza della popolazione totale di *O. oeni* sarà applicato il metodo in Q-PCR secondo quanto riportato da Pinzani et al. 2004 sviluppato sulla sequenza specifica dell'enzima

malolattico di *O. oeni*. A tal fine saranno presi in considerazione 10 colture in mezzo sintetico (condotte in triplo) e 10 campioni di vino inoculati in triplo con ceppi di *O. oeni* a diversa densità cellulare in modo da individuare il limite delle cellule rilevabile col metodo molecolare. La determinazione quantitativa sarà effettuata in parallelo con il metodo tradizionale della conta su piastra e il metodo in Q-PCR. Inoltre, saranno analizzati 20 campioni di vino prelevati nel corso di FML commerciali diversi per tipologia di uve utilizzate e per tecniche o condizioni di vinificazione adottate.

**B.3b.2** Disegno di primer specifici per i geni *hdc* e *odc* e validazione dei protocolli di PCR

Successivamente, sarà necessario individuare le sequenze per i primers specifici e le sonde marcate con fluorocromi, per i geni codificanti l'istidina decarbossilasi (HDC) e l'ornitina decarbossilasi (ODC) considerando le sequenze indicate al punto B.3a.1.

Questa metodologia verrà utilizzata per caratterizzare a livello molecolare i vari ceppi di *O. oeni* (*hdc/odc* positivi o negativi) già caratterizzati sulla base della loro capacità o meno di produrre istamina e putrescina in coltura e verrà applicata a modelli sperimentali di vino artificiale. Il gene codificante l'enzima malolattico sarà utilizzato per quantificare la popolazione totale di *O. oeni*, mentre i geni codificanti l'istidina decarbossilasi e l'ornitina decarbossilasi saranno utilizzati per quantificare i ceppi *hdc* e *odc* positivi. A questo scopo sarà valutata la possibilità di sviluppare una metodica multiplex di Q-PCR, ovvero un protocollo unico per la contemporanea determinazione della popolazione batterica capace di produrre istamina e putrescina.

**B.3b.3** Applicazione dei protocolli di PCR e Q-PCR nel corso di FML su scala pilota

I protocolli sviluppati nelle fasi precedenti saranno applicati a campioni di vino naturale per il monitoraggio della popolazione totale di *O. oeni*

e della eventuale popolazione capace di produrre istamina e putrescina durante il processo di vinificazione (verranno analizzate 3 delle vinificazioni sperimentali provenienti dalla ricerca B.2). I campioni verranno prelevati nel corso del processo fermentativo e per ciascuno di essi verrà effettuata la determinazione quantitativa della popolazione di *O. oeni* mediante protocollo Q-PCR e parallelamente sarà condotta l'analisi HPLC per rilevare l'eventuale presenza di AB.

**B.3c.: Definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che limitano o favoriscono la formazione di amine biogene in vino da parte di *O. oeni*.**

Questa fase della ricerca si propone di valutare i fattori in grado di influenzare la produzione di AB in vino da parte di *O. oeni*, al fine di acquisire alcune conoscenze per prevenire o comunque limitare la formazione o l'accumulo di tali molecole in vino. Pertanto, verrà indagata l'influenza di fattori multipli quali:

- concentrazione di zuccheri
- concentrazione di acido malico
- concentrazione di aminoacidi precursori
- etanolo
- pH

L'attività verrà così articolata:

**B.3c.1. Costruzione di un disegno sperimentale per la valutazione di fattori multipli sulla formazione di amine biogene**

Per questa sperimentazione saranno impiegati due ceppi di *O. oeni* dotati di un diverso corredo enzimatico per cui uno risulta capace di formare putrescina da arginina e il secondo a partire da ornitina. Infatti la putrescina può essere formata direttamente da ornitina da parte di ceppi dotati di attività ornitina-decarbossilasica oppure da arginina da parte di ceppi dotati della via degradativa arginina deiminasi (ADI) e dell'attività decarbossilasica a carico dell'ornitina (prodotto intermedio della via ADI).

Per prima cosa verrà costruito un disegno sperimentale che consenta di valutare l'effetto interattivo delle variabili prese in considerazione sul rilascio di AB. Le cellule ottenute da precolture di 96-120 ore a 30°C verranno risospese in un mezzo tampone contenente i precursori delle AB e nel quale verranno variate le variabili prese in considerazione, secondo quanto previsto da disegno sperimentale. La sospensione cellulare contenente un numero definito di cellule verrà incubata per 24 ore a 30°C, dopodichè i surnatanti verranno analizzati mediante HPLC per valutare il rilascio di AB mentre la sopravvivenza cellulare sarà valutata mediante conta su piastra.

#### **B.3c.2. Analisi statistica**

I dati sperimentali ottenuti nella precedente fase verranno elaborati secondo equazioni polinomiali per ottenere modelli capaci di descrivere la produzione di AB in relazione alle variabili considerate. In questo modo verranno ricavate le equazioni e i relativi grafici di superficie capaci di descrivere la produzione delle diverse AB in relazione alle variabili prese in considerazione.

#### **4) Risultati attesi.**

##### ***B.3.a: Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di O. oeni produttori di istamina e putrescina.***

La presente sperimentazione consentirà la messa a punto di una metodica rapida capace di individuare la presenza di ceppi produttori di AB direttamente in vino. Un protocollo di questo tipo potrà essere impiegato per tenere sotto controllo sia fermentazioni spontanee sia quelle inoculate e consentirà di intervenire prima che si manifesti il problema e che quindi il vino risulti inesorabilmente danneggiato.

##### ***B.3.b: Sviluppo di un metodo in Real Time PCR (Q-PCR) per la quantificazione della popolazione di O. oeni capace di produrre istamina e putrescina***

La presente sperimentazione consentirà la messa a punto di una metodica rapida capace di quantificare le popolazioni di *O. oeni* potenzialmente responsabili della formazione di AB rispetto ad una popolazione batterica totale. La messa a punto di un protocollo per l'applicazione della tecnica della PCR quantitativa direttamente a campioni di vino naturali, evitando la conta microbica su piastra, costituisce, un efficace strumento per il controllo della FML.

**B.3.c: Definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che influenzano la formazione di amine biogene in vino da parte di *O. oeni*.**

La presente sperimentazione consentirà di individuare i possibili fattori in grado di influenzare la produzione di AB in vino da parte di *O. oeni*. In altri termini, consentirà di valutare quanto un vino, in base alla sua composizione chimica, sia esposto al rischio della formazione di AB, nel caso ovviamente che questo contenga, nella sua microflora indigena, ceppi potenzialmente capaci di formare queste sostanze. Conoscendo quindi l'eventuale rischio della formazione di AB durante la fermentazione malolattica, sarà possibile individuare la tipologia di interventi capaci di prevenire la formazione di queste sostanze.

**5) Riferimenti bibliografici.**

- Busto O., Guash J., Borrull F. (1996) Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. *Journal International des Sciences de la vigne et du Vin*, 30: 85-101
- Buteau C., Duitschaever C. L. e Ashton G. C. (1984). A study of the biogenesis of amines in a Villard Noir wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 35: 228-235.
- Coton E., Rollan G. C., Lonvaud-Funel A. (1998). Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of *hdc* gene. *J. Appl. Microbiol.* 84: 143-151
- Gloria M.B.A., Watson B.T., Simon-Sarkadi L. e Daeschel M.A. (1998). A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 279-282.

- Granchi L., Talini D., Rigacci S., Guerrini S., Berti A., Vincenzini M. (2005). Detection of putrescine-producer *Oenococcus oeni* strains by PCR. 8<sup>th</sup> Symposium on Lactic Acid Bacteria (book of abstracts: C 030).
- Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M.. (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.* 44: 374-378
- Guerrini S., Bastianini A., Blaiotta G., Granchi L., Moschetti G., Coppola S., Romano P., Vincenzini M. (2003). Phenotypic and Genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 1-14
- Henick-Kling T. (1993). Malo-lactic Fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet G.H., Chur:Harwood Academic Publishers. 289-326.
- Kunkee R.E. (1991). Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Rev.*, 88: 55-72.
- Lonvaud-funel A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 317–331.
- Lonvaud-Funel A. e Joyeux A. (1994) Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 401-407.
- Mangani S., Galli C., Guerrini S., Granchi L. e Vincenzini M.: Sviluppo delle popolazioni microbiche ed accumulo di ammine biogene in vinificazione. *Vigne e Vini*, *in stampa*.
- Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. (2005). Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiol.* 51: 6-10
- Marcobal A., de las Rivas B., Moreno Arribas M. V. (2004). Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters* 239: 213-220.
- Pinzani, P., Bonciani L., Pazzagli M., Orlando C., Guerrini S. e Granchi L.. (2004). Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 118-124
- Silla Santos M.H. (1996) Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231.

- Sponholz W. R. (1993). Wine spoilage by microorganism. In: Wine Microbiology and Biotechnology. (Fleet G.H. ed.), Chur:Harwood Academic Publishers. 289-326.
- Ten Brink B., Damink C., Joosten H.M.L.J. e Huis in't Veld J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in food. Int. J. Food Microbiol. 11: 73-84,.
- Tourdot-Maréchal R., Gaboriau D., Beney L., Diviès C. (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. Int. J. Food Microbiol. 55: 269-273
- Vidal-Carou M. C., Ambatille-Espunyes A. (1990). Ulla-Ulla M. C. e Mariné-Font A. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the winemaking process. Am. J. Enol. Vitic. 41:160-167.
- Zapparoli G., Torriani S., Presente P., Dellaglio F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. Lett. Appl. Microbiol. 27: 243-246.

## 6) Piano e cronoprogramma delle attività

CODICE	AZIONE	CODICE	SOTTOAZIONE	ANNO
B.3a	Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di <i>O. oeni</i> produttori di istamina e putrescina	B.3a.1	Disegno di primer specifici per i geni <i>hdc</i> e <i>odc</i> e messa a punto dei protocolli di amplificazione PCR	I
		B.3a.2	Validazione dei protocolli di PCR	
		B.3a.3	Sviluppo e validazione di un protocollo di estrazione di DNA da vino e amplificazione dei geni <i>hdc</i> e <i>odc</i>	
		B.3a.4	Applicazione dei protocolli di PCR nel corso di FML su scala pilota	III
B.3b	Sviluppo di un metodo in Q-PCR per la quantificazione della popolazione di <i>O. oeni</i> capace di produrre istamina e putrescina	B.3b.1	Determinazione quantitativa di <i>O. oeni</i> in vino mediante Q-PCR	II
		B.3b.2	Disegno di primer specifici per i geni <i>hdc</i> e <i>odc</i> e validazione dei protocolli di PCR	
		B.3b.3	Applicazione dei protocolli di Q-PCR nel corso di FML su scala pilota	III
B.3c	Definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che influenzano la formazione di amine biogene in vino da parte di <i>O. oeni</i>	B.3c.1	Costruzione di un disegno sperimentale per la valutazione di fattori multipli sulla formazione di amine biogene	III
		B.3c.2	Analisi statistica dati sperimentali	

### Cronoprogramma e suddivisione delle attività

I° ANNO																	
COD.	AZIONE	COD.	SOTTOAZIONI		Ge	Fe	Ma	Ap	Ma	Gi	Lu	Ag	Se	Ot	No	Di	
B.3.a	Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di <i>O. oeni</i> produttori di istamina e putrescina	B.3a.1	Disegno di primer specifici per i geni <i>hdc</i> e <i>odc</i> e messa a punto dei protocolli di amplificazione PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 isolati di <i>O. oeni</i></li> <li>- eventuale sequenza geni</li> <li>- 2 protocolli di PCR</li> </ul>													
		B.3a.2	Validazione del protocollo di PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- con diverse specie di batteri lattici</li> <li>- in presenza di <i>S. cerevisiae</i></li> <li>- screening 100 isolati di <i>O. oeni</i></li> </ul>													
		B.3a.3	Sviluppo e validazione di un protocollo di estrazione di DNA da vino e amplificazione dei geni <i>hdc</i> e <i>odc</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 metodi per eliminare inibitori PCR</li> </ul>													

II° ANNO																
COD.	AZIONI	COD.	SOTTOAZIONI		Ge	Fe	Ma	Ap	Ma	Gi	Lu	Ag	Se	Ot	No	Di
B.3b	Sviluppo di un metodo in Real-Time PCR per la quantificazione di ceppi di <i>O. oeni</i> produttori di istamina e putrescina	B.3b.1	Determinazione quantitativa di <i>O. oeni</i> in vino mediante Q-PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 fermentazioni in triplo in mezzo sintetico</li> <li>- 10 fermentazioni in triplo in vino</li> <li>- -20 campioni vino</li> </ul>												
		B.3b.2	Disegno di primer specifici per i geni <i>hdc</i> e <i>odc</i> e validazione dei protocolli di PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 ceppi di <i>O. oeni</i></li> <li>- verifica specificità primer</li> </ul>												

III° ANNO																
COD.	AZIONI	COD.	SOTTOAZIONI		Ge	Fe	Ma	Ap	Ma	Gi	Lu	Ag	Se	Ot	No	Di
B.3c	Definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che influenzano la formazione di amine biogene in vino da parte di <i>O. oeni</i>	B.3c.1	Costruzione di un disegno sperimentale per la valutazione di fattori multipli sulla formazione di amine biogene	(I° ceppo di <i>O.oeni</i> ) 33 fermentazioni												
				(II° ceppo di <i>O.oeni</i> ) 33 fermentazioni												
		B.3c.2	Analisi statistica risultati fermentazioni													
B.3a B.3b		B.3a.4 e B.3b.3	Applicazione dei protocolli di PCR e di RT-PCR nel corso di FML su scala pilota	- 3 vinificazioni ricerca B.2												

## **7) Competenze attinenti al Progetto**

Nella sezione di Microbiologia del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie opera un gruppo di ricerca che ha consolidata esperienza nello studio della eco-fisiologia, biochimica e biodiversità fenotipica e genotipica di microrganismi di interesse per il settore viti-vinicolo, con particolare attenzione ai batteri lattici responsabili della fermentazione malolattica nei vini. L'attività di ricerca svolta sull'argomento ha prodotto pubblicazioni su riviste scientifiche e comunicazioni a congressi, ha favorito la partecipazione del gruppo a progetti di ricerca di interesse nazionale e ha promosso la stipula di convenzioni di ricerca con numerose aziende vitivinicole. Inoltre, la Sezione dispone di una ricca collezione di batteri lattici e di lieviti isolati da vini italiani di diversa origine. Attrezzature utilizzate per la ricerca

### **Attrezzature utilizzate per la ricerca**

Per la realizzazione della ricerca saranno utilizzate attrezzature tecnico-scientifiche di cui è dotata la Sezione di Microbiologia quali: Cromatografo liquido (HPLC) con rivelatori UV-VIS e fluorescenza, Gascromatografo a colonne capillari ed impaccate, Spettrofotometro UV/Vis, Centrifuga refrigerata, Microscopio ottico con dispositivo a contrasto di fase e epifluorescenza, Termociclatori per reazioni di PCR, Apparecchiatura per elettroforesi, Camera digitale con sistema di acquisizione immagini (Gel Compar software).

Il raggiungimento degli obiettivi proposti è garantito anche dalla disponibilità presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie di una piattaforma di genomica, proteomica e fenomica (Laboratorio GENEXPRESS) dotata di strumentazione ad alta processività (sequenziatore a 96 capillari, Mega-BACE, Amersham Biosciences; analizzatore di immagini in fluorescenza e chemiluminescenza, Typhoon 9200 Amersham Biosciences; microarray scanner, Scan Array GX-PerkinElmer; Multiprobe II HTEX-PerkinElmer; Phenotype Microarrays System, Biolog; evoluti software per lo sviluppo di database genomici, per l'analisi genomica e la filogenesi molecolare, Bionumerics-Applied Maths)

### **Curriculum della Prof.ssa. Lisa Granchi**

**Lisa Granchi** è nata il 01.04.1959 a Firenze, dove si è laureata in Scienze Biologiche nel 1987. Dal 1987 al 1990 ha collaborato, presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università degli Studi di Firenze, ad attività di ricerca inerente l'ecologia e la fisiologia dei lieviti vinari ed ha svolto, in qualità di borsista, la ricerca "Agenti e metaboliti della fermentazione malolattica del vino Chianti Classico". Dal 1990 al 1994 ha partecipato, presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (ora Dipartimento di Biotecnologie Agrarie) dell'Università di Firenze a vari progetti di ricerca riguardanti lo studio di lieviti e batteri malolattici di interesse enologico ed ha svolto attività professionale nel settore enologico e lattiero-caseario. Dal 1995 è Ricercatore (confermato nel ruolo alla fine del primo triennio di attività) del settore scientifico-disciplinare AGR/16 (Microbiologia Agraria) presso la Facoltà di Agraria dell'Università di Firenze- Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, con regime di impegno a tempo pieno. Nel 2004 è stata dichiarata idonea nella valutazione comparativa per la copertura di un posto di professore di ruolo di seconda fascia per il settore scientifico disciplinare AGR/16- Microbiologia Agraria presso la Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali dell'Università degli Studi dell'Insubria (Como), e dal 01/11/2005 prenderà servizio presso l'Università degli Studi di Firenze, Facoltà di Agraria.

L'attività di ricerca scientifica, riguardante la microbiologia enologica, è rivolta allo studio delle seguenti tematiche: selezione e caratterizzazione fisiologico-biochimica di ceppi batterici di *Oenococcus oeni* da impiegare come colture *starter* per il controllo della fermentazione malolattica in vino, sviluppo ed applicazione di metodi molecolari per l'identificazione e la tipizzazione di batteri lattici, sviluppo ed applicazione di metodi rapidi per lo studio delle popolazioni di lievito nel corso della vinificazione, Caratterizzazione fisiologico-biochimica di lieviti vinari.

Attualmente svolge attività didattica presso la Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Firenze ricoprendo l'insegnamento di corsi ufficiali della Laurea in Viticoltura ed Enologia, della Laurea Magistrale in Enologia e della Laurea Magistrale in Gestione della Qualità dei prodotti Alimentari. E' membro di diverse società italiane di microbiologia, in particolare è membro della delegazione italiana dell'O.I.V. (Office International de la Vigne et du Vin).

### **Pubblicazioni (più importanti negli ultimi 5 anni)**

1. Bastianini A., Granchi L., Guerrini S., Vincenzini M.. (2001). Fatty acid composition of malolactic *Oenococcus oeni* strains exposed to pH and ethanol stress. *Ital. J. Food Sci.*, 12: 333-342.
2. Vincenzini M., Granchi L., Guerrini S., Materassi R.. (2001). Problematiche della gestione della fermentazione malolattica in vino. *Ind. Bevande*, XXX: 18-24.
3. Guerrini S., Bastianini A., Granchi L., Vincenzini M.. (2002). Effect of oleic acid on *Oenococcus oeni* strains and malolactic fermentation in wine. *Curr. Microbiol.*, 44: 5-9.
4. Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M.. (2002). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.*, 44: 374-378.
5. Granchi L., Ganucci D., Messini A., Vincenzini M. (2002). Oenological properties of *Hanseniaspora osmophila* and *Kloeckera corticis* from wines produced by spontaneous fermentations of normal and dried grapes. *FEMS Yeast Res.*, 2: 403-407.
6. Granchi L., Ganucci D., Viti C., Giovannetti L., Vincenzini M. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with "adequate" and "inadequate" assimilable-nitrogen content. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36: 54-58.
7. L. Granchi, S. Mangani, D. Talini e S. Rigacci. (2003). Isolamento del gene della ornitina decarbossilasi di *Oenococcus oeni*. 6° Congresso Italiano di scienza e Tecnologia degli Alimenti, Cernobbio (Como), 18-19 settembre, Atti del Convegno, p.59
8. Guerrini S., Bastianini A., Blaiotta G., Granchi L., Moschetti G., Coppola S., Romano P., Vincenzini M.. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int. J. Food Microbiol.*, 83: 1-14.
9. Romano P., Granchi L., Caruso M., Borra G., Palla G., Fiore C., Ganucci D., Caligiani A., Brandolini V. (2003). The species-specific ratios of 2,2-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. *Int. J. Food Microbiol.*, 86: 163-168.

10. Pinzani P., Bonciani L., Pazzagli M., Orlando C., Guerrini S., Granchi L. (2004). Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 118-124.
11. Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. (2005) Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.*, 51: 6-10.
12. Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M. (2005): Ruolo dei microrganismi nella produzione di AB in vino. *VQ*, 2: 8-16
13. Granchi L., Guerrini S., Vincenzini L. "I batteri lattici e la fermentazione malolattica" 2005 In: *Microbiologia del vino*" pp. 261-289 Ed. Vincenzini M., Romano P., Farris G.A., Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
14. Mangani S., Galli C., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M.: Sviluppo delle popolazioni microbiche ed accumulo di ammine biogene in vinificazione. *Vigne e vini* (in stampa).
15. -Granchi L., Romano, P. Mangani S., Guerrini S., Vincenzini M., Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bulletin De L'O.I.V.* (in stampa)

### **Curriculum del Dr. Carlo Viti**

**Carlo Viti** è nato il 21.01.1964 a Montespertoli (FI), si laurea in Scienze Agrarie nel 1991. Dal 1991 al 1995 ha collaborato, presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università degli Studi di Firenze, ad attività di ricerca inerente l'ecologia e la tassonomia di differenti gruppi microbici (Cianobatteri, batteri lattici, lieviti, batteri fotosintetici anaerobi, etc.). Nel 1996 vince il concorso per una borsa di studio per il corso di Dottorato di Ricerca in Scienza del Suolo e, nel 2000, acquisisce titolo di Dottore di Ricerca discutendo una tesi dal titolo "Studio della comunità microbica di suoli che contengono differenti livelli di cromo. Dal 2002 è ricercatore presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie e la sua attività di ricerca riguarda prevalentemente l'ecologia microbica del suolo e l'applicazione di tecniche molecolari per la tipizzazione e la classificazione dei microrganismi. Durante la sua attività partecipa a numerosi progetti di ricerca nazionali ed internazionali e dal 2003 è coordinatore di un Progetto di ricerca scientifica quadriennale d'Ateneo (ex quota 60%) dal titolo "Analisi della diversità di microrganismi di interesse agro-industriale e ambientale".

### **Pubblicazioni (più importanti negli ultimi 5 anni)**

1. Ciapini A., R. Dei, C. Sacco, S. Ventura, C. Viti and L. Giovannetti (2002) Phenotypic and genotypic characterisation of *Aeromonas* isolates. *Annals of Microbiology* 52: 339-352.
2. Viti, C., A. Pace and L. Giovannetti (2003) Characterisation of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from chromium contaminated soil by tannery activity. *Current Microbiology* 46:1-5
3. Margheri, M. C., R. Piccardi, S. Ventura, C. Viti and L. Giovannetti (2003) Genotypic diversity of oscillatoriacean strains belonging to the form-genera *Geitlerinema* and *Spirulina* determined by 16S rDNA restriction analysis. *Current Microbiology* 46: 359-364.

4. Granchi L., D. Ganucci, C. Viti, L. Giovannetti, and M. Vincenzini. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Letters in Applied Microbiology* 36:54-58.
5. Brusetti L., P. Francia, C. Bertolini, A. Pagliuca, S. Borin, C. Sorlini, A. Abruzzese, G. Sacchi, C. Viti, L. Giovannetti, E. Giuntini, M. Bazzicalupo, and D. Daffonchio (2004) Bacterial rhizosphere community of transgenic Bt 176 maize and its non transgenic counterpart. *Plant and Soil* 266: 11-24.
6. Viti C., F. Decorosi, A. Mini, G. Rosi and L. Giovannetti. (2004) Effects of chromate on culturable and non-culturable soil bacterial community. *Proceedings European Symposium on Environmental Biotechnology*, A.A.Balkema Publishers, pp 399-402.
7. Viti C., F. Decorosi, A. Mini and L. Giovannetti (2004) Microrganismi rizosferici e fitorimediazione. *In: Fitorimediazione- bonificare con le piante*. Mancuso S. (ed.) pp. 38-42.
8. Viti C. and L. Giovannetti (2005) Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Applied Soil Ecology* 28: 101-112.
9. Marchi G., C. Viti, L. Giovannetti and G. Surico (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology* 112: 101-112.
10. Decorosi F., C. Viti, A. Mengoni, M. Bazzicalupo and L. Giovannetti (2005). Improvement of the cDNA-AFLP method using fluorescent primers for transcription analysis in bacteria. *Journal of microbiological methods*. disponibile online 4 giugno 2005.
11. Mengoni A., E. Tatti, F. Decorosi, C. Viti, M. Bazzicalupo, L. Giovannetti (2005). Comparison of 16SrRNA and 16SrDNA T-RFLP bacterial community in soil microcosms treated with chromate. *Microbial Ecology*. In stampa.
12. Viti C. and Giovannetti L, (2005). Bioremediation of soils polluted with hexavalent chromium using bacteria-the challenge. In " Bioremediation-a novel technology' S.N. Singh e Triphati (eds.). In stampa.

13. Viti C., A. Mini, G. Ranalli, G. Lustrato and L. Giovannetti (2005). Response of microbial communities to different doses of chromate. Sottomesso per la pubblicazione su *Applied Soil Ecology*.

### **Curriculum della Dr. Simona Guerrini**

**Simona Guerrini** è nata Vinci il 3/2/71 e si è laureata in *Scienze Biologiche* nell'anno accademico 1996-97 presso la facoltà di *Scienze Matematiche Fisiche e Naturali* dell'Università di Pisa con la votazione di 110 e lode /110. Nella sessione di novembre '98 ha superato l'esame di stato ottenendo l'abilitazione all'esercizio della professione di Biologo. Nel Luglio 2003 ha sostenuto e superato con successo l'esame finale previsto dal dottorato di ricerca in BIOTECNOLOGIE MICROBIOLOGICHE AGRARIE bandito dall'*Università di Firenze* della durata di tre anni con una tesi dal titolo: "Indagini sulla variabilità fenotipica e genotipica di ceppi malolattici di *Oenococcus Oeni*".

Nel gennaio 1999 ha iniziato una collaborazione coordinata e continuativa con il *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche dell'Università di Firenze* per svolgere una attività di ricerca finalizzata alla caratterizzazione fisiologico - biochimica di ceppi di *Oenococcus oeni*.

Dal maggio all'agosto 1999 ha fornito una prestazione professionale per conto del *Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Foretali dell'Università degli Studi della Basilicata*, finalizzata all'isolamento e caratterizzazione di batteri lattici isolati da vini delle regioni meridionali.

Da Settembre a Dicembre 1999 ha ripreso la collaborazione coordinata e continuativa con il *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche dell'Università di Firenze* per svolgere una attività di ricerca finalizzata alla caratterizzazione molecolare (tecniche PCR) di ceppi di *Oenococcus oeni*.

Attualmente è assegnista presso il *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche dell'Università di Firenze* ed è codocente per il corso di Microbiologia Generale del corso di laurea in "Tecnico della prevenzione nei luoghi e negli ambienti di lavoro". E' cultore della materia per corsi di Microbiologia Generale e di Microbiologia Industriale degli Alimenti del corso di laurea in "Scienze e Tecnologie Alimentari" e svolge le esercitazioni di laboratorio per il corso di Microbiologia Industriale degli Alimenti.

### **Curriculum della Dr. Silvia Mangani**

**Silvia Mangani** è nata Firenze il 24/07/1971 dove si è laureata in *Chimica e Tecnologie Farmaceutiche* nell'anno accademico 1996-97 presso la facoltà di *Farmacia* dell'Università degli Studi di Firenze con la votazione di 110 e lode /110. Nella sessione di novembre '98 ha superato l'esame di stato ottenendo l'abilitazione all'esercizio della professione di Farmacista. Nel Febbraio 2005 ha sostenuto e superato con successo l'esame finale previsto dal dottorato di ricerca in BIOTECNOLOGIE MICROBIOLOGICHE AGRARIE bandito dall'*Università di Firenze* della durata di tre anni con una tesi dal titolo: "Il ruolo dei microrganismi vinari nella formazione e nell'accumulo di amine biogene nel vino". Nel settembre 1999 ha iniziato una collaborazione coordinata e continuativa con il *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche dell'Università di Firenze* per svolgere una attività di ricerca sulla diffusione della capacità di produrre amine biogene nella specie *Oenococcus oeni*.