



in cantina

□ LISA GRANCHI\*, MATTEO BRONZINI\*

Durante gli ultimi anni nel settore enologico una crescente attenzione è stata rivolta alle possibili relazioni tra alcune proprietà del prodotto finito e la salute del consumatore, tanto che il concetto di qualità del vino ha assunto un significato più ampio, includendo non solo le caratteristiche chimiche e organolettiche ma anche quelle salutistiche. In vino, infatti, si possono trovare alcuni composti che, a seconda della loro natura e della loro concentrazione, sono in grado di esercitare un effetto positivo o negativo sulla salute dell'uomo.

A questo proposito, recentemente numerosi studi condotti su vini prodotti in diversi Paesi europei hanno evidenziato che nell'ambito del processo di vinificazione la fermentazione malolattica (FML) è da ritenere la fase più critica per la produzione di amine biogene (AB), sostanze che si formano in seguito alla decarbossilazione degli aminoacidi precursori per opera dei batteri lattici e che, essendo biologicamente attive sul sistema nervoso e vascolare, possono provocare nell'uomo mal di testa, rossori, palpitazioni e diverse reazioni allergiche in funzione della loro concentrazione e della sensibilità individuale. Tra i batteri lattici, la capacità di produrre AB è stata per molto tempo attribuita a ceppi appartenenti ai generi *Pediococcus* e *Lactobacillus* ma più recentemente è stato dimostrato che anche *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente responsabile della FML spontanea e indotta in vino, è capace di produrre AB quali istamina, cadaverina, putrescina e tiramina, con differenze quali-quantitative in funzione del ceppo considerato. Alla luce di quanto esposto, lo sviluppo di metodi diagnostici rapidi che permettano il riconoscimento e la quantificazione dei ceppi di *O. oeni* capaci di decarbossilare gli aminoacidi precursori delle AB appare una valida strategia per il controllo della FML e può contribuire alla tutela della qualità

Tra gli effetti sgradevoli che le amine biogene contenute nel vino possono determinare vi è il mal di testa.

# PER VINI SENZA AB

TECNICHE MIRATE DI BIOLOGIA MOLECOLARE CONSENTONO DI INDIVIDUARE IN VINO I CEPPI DI BATTERI MALOLATTICI PRODUTTORI DI AMINE BIOGENE. INDESIDERATE PERCHÉ DANNOSE PER LA NOSTRA SALUTE

del vino, assicurando un prodotto non solo con determinate caratteristiche organolettiche desiderate ma anche sicuro ai fini della salute del consumatore.

Pertanto il presente lavoro – che rappresenta la prima fase del progetto di ricerca *Il controllo della fermentazione malolattica per la tutela della qualità del vino*, finanziato dalla Società Consortile Toscana Srl – ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un metodo di biologia molecolare rapido, basato sulla tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction), per l'individuazione di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre in vino istamina e putrescina in seguito alla decarbossilazione, rispettivamente, di istidina e ornitina, i corrispondenti aminoacidi precursori. In effetti, l'istamina è riconosciuta come l'amina biogena dotata di maggiore tossicità per l'uomo, mentre la putrescina è l'amina presente in vino a maggiori concentrazioni e che più efficacemente potenzia l'effetto tossico dell'istamina. La capacità di produrre tali AB non è una caratteristica dell'intera specie di *O. oeni* ma è limitata a quei ceppi che sono in possesso dei geni codificanti gli enzimi istidina decarbossilasi (*hdc*) e ornitina decarbossilasi (*odc*) e che mostrano attiva la loro espressione. Inoltre occorre evidenziare che, in accordo con quanto riportato da alcuni Autori, il gene *odc* potrebbe essere trasferito da un ceppo batterico all'altro, determinando una variabilità di comportamento tra ceppi produttori e non produttori di putrescina e il gene *hdc*, essendo localizzato su un plasmide, ovvero su una molecola circolare di Dna diversa dal cromosoma batterico e che può essere perduta dalla cellula, potrebbe essere responsabile dell'instabilità della proprietà di un ceppo di produrre istamina, rendendo ragione del fatto che ceppi istidina decarbossilasi (HDC)-positivi vengono convertiti in ceppi HDC-negativi.

#### RICONOSCERE I CEPPI PRODUTTORI DI AB

La PCR, o Reazione a Catena della Polimerasi, è una tecnica di biologia molecolare mediante la quale uno specifico frammento di

Dna, definito *Dna bersaglio* (rappresentato in questo caso dal gene *hdc* o dal gene *odc*) viene amplificato in vitro in modo esponenziale tramite cicli ripetuti di sintesi che avvengono grazie all'azione dell'enzima Dna polimerasi, la quale agisce con un meccanismo analogo a quello che avviene in natura nel processo di duplicazione dell'acido nucleico (figura 1). Per fare ciò è necessario conoscere la sequenza delle regioni adiacenti alle due estremità del frammento da amplificare, in modo da poter sintetizzare brevi sequenze nucleotidiche complementari dette *primer*, funzionanti da innesco per la Dna polimerasi, che inizia così a copiare il Dna bersaglio. In breve una reazione di PCR, che avviene in uno strumento detto termociclatore, prevede le seguenti fasi:

- denaturazione del Dna: il Dna contenuto in provette viene scaldato a una temperatura di 94-96°C per uno o più minuti per separare la doppia elica nei suoi due filamenti;



Il termociclatore, strumento all'interno del quale si svolgono le fasi della PCR.

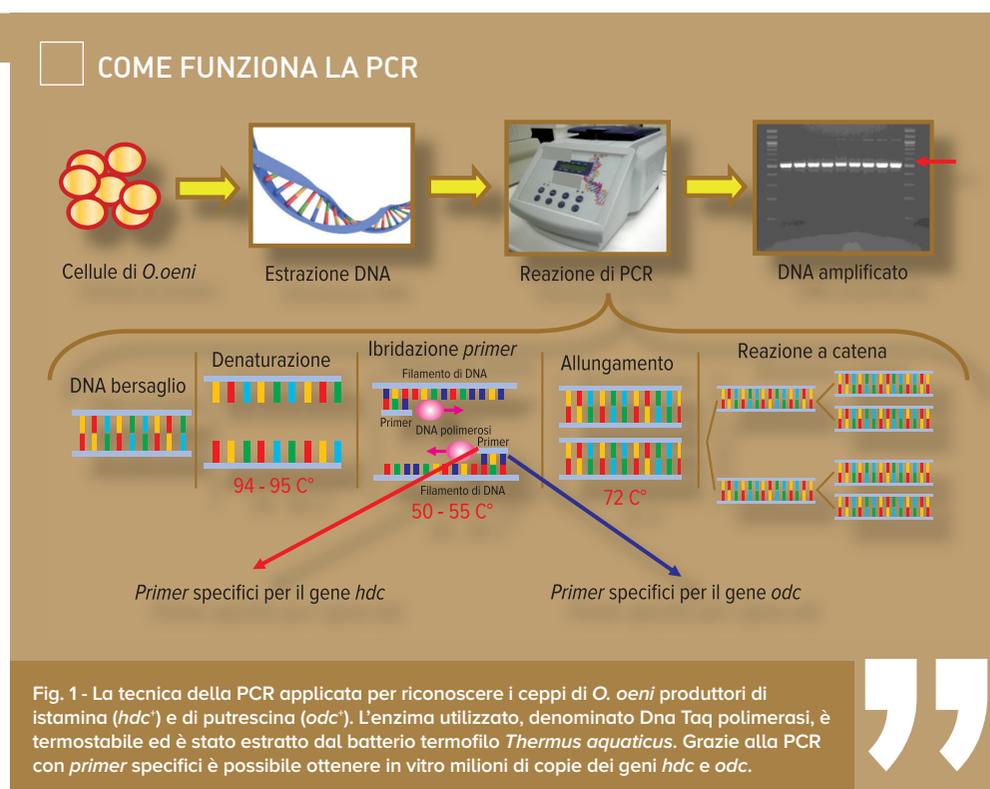


Fig. 1 - La tecnica della PCR applicata per riconoscere i ceppi di *O. oeni* produttori di istamina (*hdc*) e di putrescina (*odc*). L'enzima utilizzato, denominato Dna Taq polimerasi, è termostabile ed è stato estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*. Grazie alla PCR con *primer* specifici è possibile ottenere in vitro milioni di copie dei geni *hdc* e *odc*.

- ibridazione dei primer: la temperatura viene ridotta a 50-65°C per uno o più minuti, per consentire l'appaiamento dei due inneschi (*primer*) alle rispettive sequenze complementari presenti sul Dna, a destra e a sinistra della regione che si desidera amplificare;
- allungamento del Dna: la temperatura è portata a 72°C per uno o più minuti, durante i quali la Dna polimerasi si lega in corrispondenza dei due *primer* e, a partire da ciascuno di essi, sintetizza un nuovo filamento copiando in maniera complementare il filamento stampo di Dna.

Le tre fasi si ripetono per un numero pari a 30-40 cicli e al termine della reazione di PCR, che può richiedere un tempo di circa 2-3 ore, il prodotto ottenuto, rappresentato da milioni di copie del Dna bersaglio, viene evidenziato attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio sottoforma di una banda di una determinata dimensione, caratteristica del Dna bersaglio, che viene espressa in paia di basi (pb).

Ai fini dell'applicazione della tecnica di PCR per il riconoscimento di ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina, l'attività sperimentale svolta nel presente lavoro ha previsto le seguenti fasi:

- reperimento dei ceppi batterici da analizzare;
- disegno di *primer* specifici per i geni *hdc* e *odc* e sviluppo dei protocolli di PCR;
- validazione dei protocolli di PCR.

#### Quali ceppi batterici analizzare?

In questa fase 38 ceppi di *O. oeni*, isolati durante la FML spontanea da vini italiani di diversa provenienza contenenti AB, sono stati caratterizzati per la loro capacità di produrre o meno istamina e putrescina mediante crescita in mezzo sintetico contenente istidina e ornitina e successiva analisi tramite High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In base ai dati rilevati, 10 ceppi batterici sono risultati produttori di istamina e 8 produttori di putrescina.

#### I primer specifici

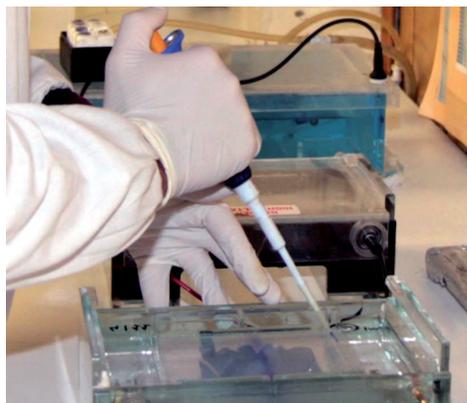
Per i ceppi di *O. oeni* risultati produttori di AB è stata valutata, dopo estrazione del Dna, la presenza dei geni *hdc* e *odc* mediante lo sviluppo di un protocollo di PCR con primer spe-

cifici sintetizzati *ex novo* e utilizzando i ceppi batterici non produttori come controllo negativo. I prodotti di amplificazione ottenuti sono stati quindi sottoposti a sequenziamento al fine di confermare l'appartenenza della loro sequenza nucleotidica ai geni *hdc* e *odc*.

La figura 2 mostra la sequenza dei primer utilizzati per l'amplificazione del gene *odc*, codificante per l'ornitina decarbossilasi, e i risultati ottenuti dopo la reazione di PCR per gli 8 ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina. L'allineamento con le sequenze depositate nella banca dati di ncbi ha fornito valori di omologia con il ceppo di *Oenococcus oeni* BIFI-83 pari al 98%, confermando l'appartenenza delle regioni geniche sequenziate a quella del gene *odc*.

#### Validazione dei protocolli di PCR

Successivamente, la specificità dei protocolli sviluppati è stata valutata utilizzando Dna



Caricamento dei risultati della PCR su gel di agarosio.

estratto da co-culture liquide di ceppi di *O. oeni* (che avevano dato amplificazione dei geni *hdc* e *odc*) con altre specie di batteri lattici presenti in vino, quali *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp., e con il lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Dal momento che l'amplificazione dei geni codificanti l'istidina decarbossilasi e l'ornitina decarbossilasi è stata ottenuta esclusivamente nelle co-culture in cui erano presenti gli isolati di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina, la specificità dei protocolli di PCR utilizzati è risultata confermata.

## Cos'è Toscana

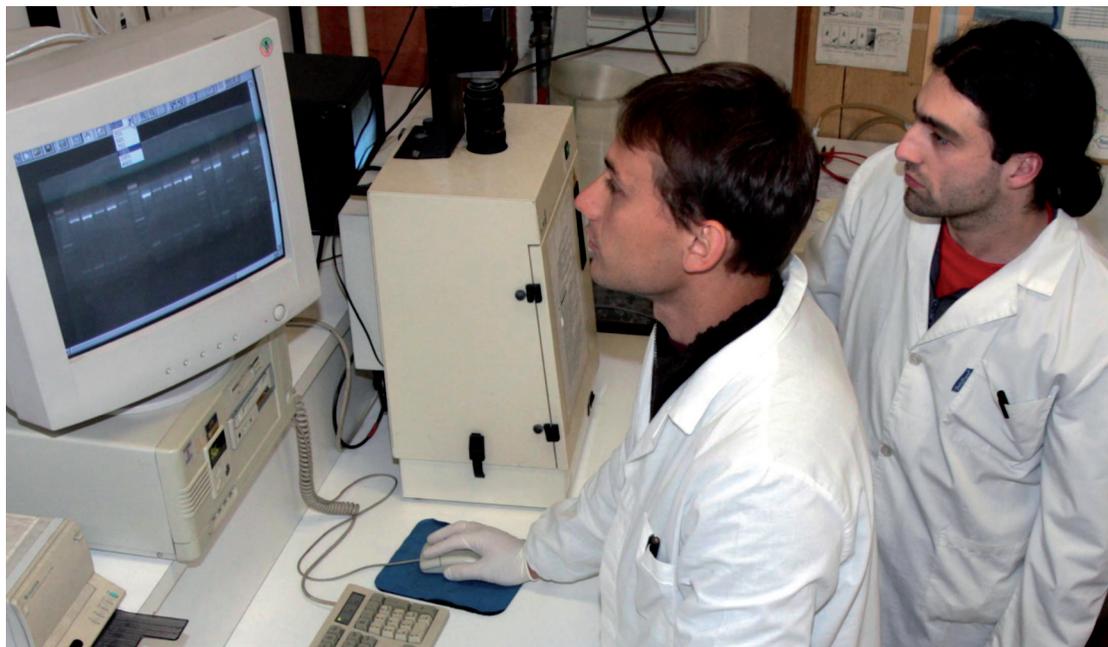


Il Consorzio Toscana è una struttura di ricerca applicata nata per iniziativa di alcune importanti aziende del settore vitivinicolo e dedicata alla realizzazione di un progetto di ricerca istituzionale (Contratto di Programma del Ministero dello Sviluppo Economico). Sulla base delle istanze di innovazione e approfondimento delle aziende socie, il Consorzio Toscana coinvolge e finanzia le strutture di ricerca istituzionali (Università e Istituti di ricerca) collaborando con essi e coordinando attivamente le fasi di validazione applicativa (che avvengono nei vigneti e nella Cantina Sperimentale del Consorzio). L'obiettivo è quello di produrre un risultato di ricerca applicativo direttamente utilizzabile e divulgabile nelle aziende che hanno voluto il progetto e, contemporaneamente, quello di avvicinare il mondo della ricerca alla realtà e alle esigenze del mondo della produzione. Il progetto *Controllo della fermentazione malolattica per la tutela della qualità del vino*, di cui il lavoro presentato in questo articolo costituisce la prima fase, ha come obiettivo lo sviluppo di metodi diagnostici rapidi per il riconoscimento e la quantificazione dei ceppi di *O. oeni* capaci di formare amine biogene, per ottenere un vino più sicuro ai fini della salute del consumatore. Le due successive fasi di lavoro previste sono lo sviluppo e l'applicazione di un metodo rapido per quantificare la popolazione totale di *O. oeni* in vino e i ceppi produttori di putrescina e istamina e la definizione di condizioni ambientali e di parametri nutrizionali in grado di influenzare la produzione di amine biogene in vino.

#### DIRETTAMENTE IN VINO

È stata infine sviluppata una metodica di estrazione del Dna totale direttamente da vino con successiva verifica del funzionamento della reazione di PCR per l'amplificazione dei geni *hdc* e *odc* di ceppi di *O. oeni*. Infatti è noto che alcune sostanze presenti in vino, come i polifenoli, interferiscono con la reazione di PCR, inibendola o diminuendone l'efficienza. In figura 3 sono mostrati i risultati ottenuti dall'amplificazione del gene *odc* dopo estrazione diretta del Dna da un campione di vino, i quali dimostrano la possibilità di rilevare ra-

Visualizzazione dei risultati della PCR dopo corsa su gel di agarosio.



## Le amine biogene nel vino

Le amine biogene più frequenti sono: istamina, tiramina e 2-feniletilamina – dotate di maggiore tossicità – e putrescina, cadaverina, spermina e spermidina che, pur non essendo di per sé molto tossiche, potenziano gli effetti delle altre AB (tabella sottostante) e rappresentano possibili precursori per la formazione delle nitrosoamine, sostanze potenzialmente cancerogene. Sebbene nel vino siano stati riscontrati tenori di AB più bassi rispetto ad altri alimenti fermentati, gli effetti tossici risultano potenziati sia dalla concomitante presenza di diverse AB (effetto sinergico) sia

Amina	Aminoacido precursore	Effetti tossici sull'uomo
Istamina	Istidina	Ipotensione, mal di testa, eruzioni cutanee, arrossamenti, nausea, vomito, diarrea
Tiramina	Tirosina	Iperensione, mal di testa, lacrimazione, salivazione, problemi respiratori, aumento battito cardiaco, aumento della glicemia
2-Feniletilamina	Fenilalanina	
Cadaverina	Lisina	Potenziano gli effetti delle altre amine inibendo gli enzimi coinvolti nel naturale processo di detossificazione
Putrescina	Ornitina	

dalla presenza dell'etanolo che è noto svolgere un'azione inibitrice su alcuni enzimi intestinali, le monoamino-ossidasi, coinvolti nel naturale processo di detossificazione presente nell'uomo. In vini di diversa origine le varie AB sono state riscontrate in quantità variabili da pochi mg a decine di mg/L. L'Organization Internationale de la Vigne et du Vin (Oiv) non ha ancora stabilito limiti legali per queste sostanze ma alcuni Paesi Europei hanno fissato per la concentrazione di istamina in vino valori massimi ammissibili compresi tra 2 e 10 mg/L a seconda del Paese: 2 mg/L in Germania, 6 mg/L nel Belgio, 10 mg/L in Svizzera e Austria, 8 mg/L in Francia e 4 mg/L in Olanda.

**vivai**  
**SOMMADOSSI**

Produzione e vendita  
di barbatelle di vite innestate

**PADERGNONE - Trento**  
Via Barbazan, 37  
Tel. 0461.86.40.81  
Fax 0461.34.08.37  
[www.vivaisommadossi.it](http://www.vivaisommadossi.it)  
[info@vivaisommadossi.it](mailto:info@vivaisommadossi.it)

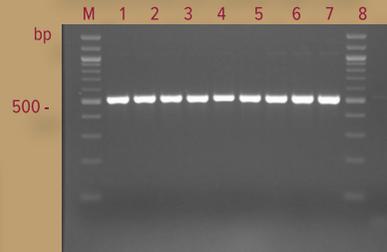
## INDIVIDUARE I CEPPI PRODUTTORI DI PUTRESCINA

- ❖ Estrazione del DNA batterico
- ❖ Reazioni di PCR con due coppie di *primer*:

1  
**PRIMER OdF:**  
 5' CATCAAGGTGGACAATATTCCG 3'  
**PRIMER OdR:**  
 5' CCGTTCAACAACCTTGTGGCA 3'

2  
**PRIMER ODC1F:**  
 5' CTGACTTTGTGGATGTTGCG 3'  
**PRIMER ODC2R:**  
 5' TCCATGCCATTAGCACCT 3'

Visualizzazione su gel di agarosio (1,2%) dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i *primer* OdF e OdR



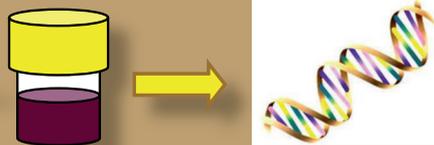
Linee 1-8: ceppi di *O. oeni odc+*  
 Linea 9: controllo positivo  
 Linea 10: controllo negativo  
 M = marker L 100

- ❖ Sequenziamento dei prodotti di amplificazione per:
  - valutare l'omologia della sequenza amplificata con sequenza depositata in banca dati;
  - confermare la corrispondenza tra prodotto di amplificazione e gene *odc*.

Fig. 2 - Principali fasi per lo sviluppo e l'applicazione della tecnica della PCR per riconoscere i ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina (*odc*<sup>+</sup>).

## IL METODO APPLICATO AL VINO

- ❖ Estrazione del DNA da vino



- ❖ Amplificazione del DNA con *primer* OdF e OdR



Reazione di PCR



Con i *primer* OdF e OdR è stata ottenuta l'amplificazione del gene *odc* dal DNA estratto direttamente da vino

Fig. 3 - Rilevazione di un ceppo di *O. oeni* produttore di putrescina dopo estrazione diretta del Dna da un campione di vino.

pidamente la presenza di un ceppo di *O. oeni* produttore di putrescina senza fare ricorso al tradizionale metodo colturale che, nel caso di *O. oeni*, richiede un tempo di circa una settimana. L'applicazione della tecnica di PCR al Dna estratto direttamente dal vino rappresenta, quindi, una tappa fondamentale in quanto richiedendo un tempo di analisi complessivo di circa 6-8 ore appare un valido strumento per effettuare il monitoraggio dei ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di riprodurre AB durante il processo di vinificazione.

### RAPIDITÀ E SEMPLICITÀ

I risultati conseguiti nel corso di questa prima fase del progetto di ricerca hanno portato allo sviluppo e alla validazione di un metodo che, grazie all'impiego di una tecnica di biologia molecolare, consente una rapida individuazione in vino di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre istamina e putrescina. Ciò dovrebbe consentire di prevenire e/o limitare tempestivamente la formazione di istamina e putrescina durante le varie fasi della vinificazione. Inoltre, tale metodo può rappresentare uno strumento utile ai fini della selezione di ceppi batterici di *O. oeni* incapaci di formare AB da impiegare come colture starter per indurre la fermentazione malolattica.

La successiva fase del progetto sarà rivolta allo sviluppo, mediante la tecnica della Real-Time PCR o PCR quantitativa, di una metodica rapida capace di quantificare le popolazioni di *O. oeni* potenzialmente responsabili della formazione di AB rispetto a una popolazione batterica totale della stessa specie. La messa a punto di un protocollo per l'applicazione della tecnica della PCR quantitativa direttamente a campioni di vino naturali, eviterà la conta microbica su piastra, rappresentando un efficace strumento per un migliore controllo della FML e della qualità del vino.

La Bibliografia può essere richiesta a [costanza.fregoni@tecnicenuove.com](mailto:costanza.fregoni@tecnicenuove.com)

\*Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, sezione di Microbiologia - Università degli Studi di Firenze Progetto di Ricerca finanziato dalla Società Consortile Toscana Srl.