

Individuazione rapida di ceppi di *Oenococcus oeni* produttori di putrescina in vino

Matteo Bronzini, Simone Augruso, Lisa Granchi

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine 24 -50144- Firenze Tel. +39 055 3288305; e-mail: matteo.bronzini@unifi.it

Progetto coordinato e finanziato da



Piazza Strozzi 1 - Firenze



Introduzione

- *Oenococcus oeni*, la specie batterica più frequentemente responsabile della fermentazione malolattica in vino, è risultata capace di produrre istamina, putrescina e altre amine biogene [1, 2] che possono indurre diversi effetti tossici nell'uomo
- Le amine biogene vengono principalmente prodotte per decarbossilazione degli amminoacidi precursori mediante enzimi substrato-specifici
- La capacità di produrre putrescina, una delle amine maggiormente presenti in vino, in seguito a decarbossilazione dell'ornitina, è limitata ai ceppi di *O. oeni* che sono in possesso del gene *odc* codificante l'ornitina decarbossilasi [3]

Scopo

Sviluppare un protocollo basato sulla tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR) finalizzato all'amplificazione specifica del gene *odc* direttamente da vino per rilevare rapidamente i ceppi di *O. oeni* capaci di produrre putrescina

Materiali e metodi

1. Crescita di 38 ceppi di *O. oeni* in mezzo sintetico contenente ornitina [4] e successiva analisi con HPLC per individuare ceppi produttori o meno di putrescina
2. Estrazione del DNA dai 38 ceppi e reazioni di PCR con due coppie di primers: ODC1F - ODC2R (Fig. 1) e OdF - OdR (Fig. 2) e sequenziamento dei prodotti amplificati
3. Validazione del protocollo di PCR attraverso amplificazione del DNA totale estratto da colture miste (*O. oeni* + *Lactobacillus* spp. + *Pediococcus* spp. + *Saccharomyces cerevisiae*)
4. Applicazione del protocollo di PCR con DNA estratto da vino dopo trattamento con polivinilpirrolidone



Risultati

- Otto ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina sono risultati *odc+* con entrambe le coppie di primers (Fig. 3)
- L'omologia tra le sequenze dei prodotti amplificati e la sequenza depositata è stata del 98% (Fig. 4)
- Il protocollo con i primers OdF e OdR è risultato specifico per l'amplificazione dell'ornitina decarbossilasi di *O. oeni*
- Con i primers OdF e OdR è stata ottenuta l'amplificazione del gene *odc* dal DNA estratto direttamente da vino

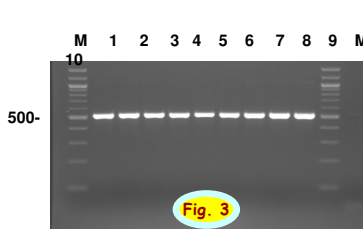


Fig. 3

Visualizzazione su gel di agarosio (1,2%) dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primers OdF e OdR: Linee da 1 a 8: ceppi di *O. oeni* *odc+*. Linea 9: controllo positivo *Lactobacillus* 30A. Linea 10: controllo negativo, M = marker L100

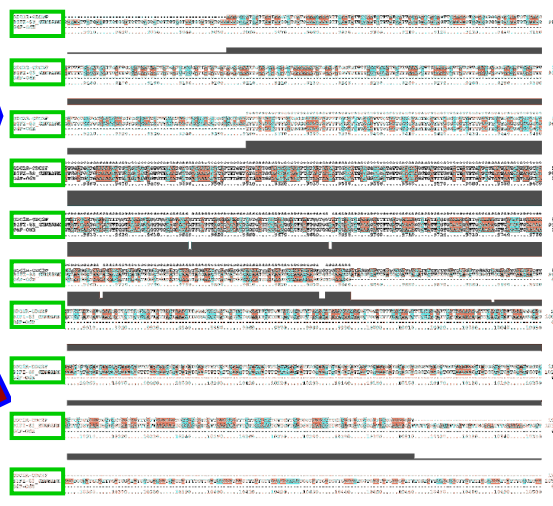
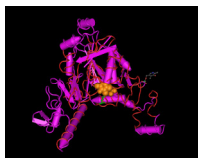


Fig. 1

PRIMER ODC1F:
CTGACTTTGGATGTTGGC

PRIMER ODC2R:
TCCATGCCATTTAGCACCT

Fig. 2

PRIMER OdF:
CATCAAGTGGACAATATTCCG

PRIMER OdR:
CCGTTCAACAACCTTGTTGGCA

Fig. 4

Allineamento delle sequenze nucleotidiche degli ampliconi ottenuti con ODC1F-ODC2R e OdF-OdR con la sequenza del gene *odc* di *O. oeni* BIFI-83 depositata in Gen-Bank

Conclusioni

Il protocollo di PCR con la coppia di primers OdF-OdR, permettendo di rilevare in tempi rapidi i ceppi di *O. oeni* potenzialmente produttori di putrescina, mediante analisi diretta di campioni di vino, rappresenta un valido strumento per il controllo della fermentazione malolattica

Bibliografia

- [1] Vincenzini et al., 2009 cap. 9 in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, König et al., Eds., Springer
 [2] Mangani et al., *Curr. Microbiol.* 2005, 51: 6-10
 [3] Marcobal et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, 239: 213-220
 [4] Bover-Cid et al., *Int. J. Food Microbiol.* 1999, 53: 33-41

Info disponibili su:
www.consorziotuscania.it