



“Il controllo della fermentazione malolattica per la tutela della qualità del vino”

Linea di ricerca B.3

Granchi L., Augruso S., Bronzini M., Mari E., Guerrini S.

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie
Sezione di Microbiologia
Piazzale delle Cascine 24, 50144 – Firenze
Tel.: + 390553288309; Fax: + 390553288272
e-mail: lisa.granchi@unifi.it



Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Biotecnologie Agrarie

06 dicembre 2010

Indice generale

Capitolo 1. Descrizione del progetto.....	4
1.1 Stato dell'arte.....	4
1.2 Obiettivi del progetto di ricerca.....	8
1.3 Articolazione delle attività di ricerca.....	8
Capitolo 2. Risultati.....	10
2.1 I anno di attività.....	10
2.1.1 Disegno di <i>primer</i> specifici per i geni <i>hdc</i> e <i>odc</i> e messa a punto dei protocolli di PCR.....	10
2.1.2 Validazione del protocollo di PCR.....	31
2.1.3 Sviluppo e validazione di un protocollo di estrazione di DNA da vino e amplificazione dei geni <i>hdc</i> e <i>odc</i>	33
2.1.4 Conclusioni del I anno di attività.....	38
2.2 II anno di attività.....	39
2.2.1 Determinazione quantitativa di <i>O. oeni</i> in vino mediante Real-Time PCR.....	39
2.2.2 Determinazione quantitativa di <i>O. oeni</i> produttori di istamina e putrescina mediante Real-Time PCR.....	52
2.2.3 Sviluppo di protocolli di multiplex PCR.....	58
2.2.4 Conclusioni del II anno di attività.....	62
2.3 III anno di attività.....	63
2.3.1 Studio dei <i>primer</i> utilizzati per l'amplificazione del gene <i>hdc</i>	64
2.3.2 Studio delle condizioni colturali per il mantenimento del gene <i>hdc</i> in <i>O. oeni</i>	66
2.3.3 Valutazione della localizzazione del gene <i>hdc</i> su plasmide.....	67
2.3.4 Valutazione delle fecce come sistema-modello per studiare la produzione di AB in vino da parte di <i>O. oeni</i>	69
2.3.5 Messa a punto di un protocollo di multiplex-PCR per individuare isolati di <i>O. oeni</i> produttori di istamina...	82
2.3.6 Influenza di fattori nutrizionali sulla produzione di AB in vino da parte di <i>O. oeni</i>	83
2.3.7 Studio dell'influenza del pH e dell'etanolo sulla produzione di AB da parte di <i>O. oeni</i> mediante un disegno sperimentale composito centrale.....	90

2.3.8 Equazioni polinomiali per descrivere la velocità di crescita di <i>O. oeni</i> in funzione del pH e dell'etano...	109
2.3.9 Equazioni polinomiali per descrivere il rilascio di AB da parte di <i>O. oeni</i> al variare di pH e etanolo.....	111
2.3.10 Analisi delle componenti principali sui risultati ottenuti con il disegno sperimentale.....	116
2.3.11 Conclusioni III anno di attività: studio di fattori multipli sulla produzione di AB.....	121
2.3.12 Applicazione dei protocolli di PCR e di RT-PCR nel corso di FML su scala pilota.....	122
 Capitolo 3. Conclusioni.....	 130
 Bibliografia.....	 132

Capitolo 1. Descrizione del progetto

1.1. Stato dell'arte

Nel processo di vinificazione la fermentazione malolattica (FML) segue di solito la fermentazione alcolica e consiste principalmente nella conversione dell'acido L-malico in acido L-lattico ed anidride carbonica ad opera di alcune specie di batteri lattici. La diretta conseguenza di tale reazione è la riduzione dell'acidità in vino e il conferimento di un gusto più morbido esaltato dalla sostituzione dell'anione malico, di sapore aspro, con l'anione lattico, molto più dolce. Tuttavia, la FML nel tempo ha progressivamente perduto importanza come pura e semplice reazione disacidificante per assumere un significato enologico più complesso. In effetti, alla FML è oggi attribuita un'azione decisiva nel conferire al vino una maggiore complessità di gusto e di aroma grazie ad attività metaboliche dei batteri lattici a carico di substrati diversi dall'acido malico, quale ad esempio l'acido citrico, e nei confronti di componenti non solo di origine fermentativa, ma anche di origine vegetale-varietale, con conseguenti effetti sul profilo sensoriale del prodotto finito apprezzati dal mercato (Lonvaud-Funel, 1999). Questi aspetti hanno reso la FML particolarmente desiderata e sempre più ricercata sia nei vini rossi che nei vini bianchi.

Oltre alla riduzione dell'acidità e alle modificazioni di altre proprietà organolettiche, tradizionalmente alla FML è stato attribuito un aumento della stabilità microbiologica del vino. Per molto tempo, infatti, è stato ritenuto che il consumo dell'acido malico e la degradazione dell'acido citrico avessero come conseguenza una minore probabilità di sviluppo microbico indesiderato. Analogamente, veniva data una valenza positiva al consumo, 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 (Granchi *et al.*, 2005). A determinare l'esito finale in vino concorrono, infatti, 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 tra batteri lattici ed altri microrganismi tra cui, in primo luogo, i lieviti. Quindi, per poter interpretare il possibile ruolo svolto dai batteri lattici ai fini della stabilità microbiologica di un vino, per prima cosa, è indispensabile conoscere le proprietà delle specie batteriche o dei ceppi che hanno condotto la FML e le condizioni ambientali. In effetti, la degradazione dei suddetti substrati, in modo particolare dei composti azotati, può portare anche alla formazione di composti dotati di proprietà negative per la salute dell'uomo.

A questo proposito, numerosi studi condotti negli ultimi anni su vini prodotti in diversi Paesi Europei (Vincenzini *et al.*, 2009; Landete *et al.*, 2007, Mangani *et al.*, 2006; Marcobal *et al.*, 2006; Guerrini *et al.*, 2002, Lonvaud-Funel, 2001), hanno evidenziato che la FML è da ritenere, nel processo di vinificazione, la fase più critica per la produzione di ammine biogene (AB), sostanze che si formano in seguito alla decarbossilazione degli aminoacidi precursori ad 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 (Silla Santos *et al.*, 1996).

Le AB 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 e rappresentano dei possibili precursori per la formazione delle nitrosoammine, 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 dalla presenza dell'etanolo che è noto svolgere un'azione inibitrice su alcuni enzimi intestinali, le monoamino-ossidasi, che sono 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 mgL^{-1} , e, nonostante non siano stati stabiliti limiti legali per queste sostanze, alcuni Paesi Europei hanno posto dei limiti massimi raccomandati in vino per la concentrazione di istamina (l'ammina biogena dotata di maggiore tossicità) compresi tra 2 e 10 mgL^{-1} a seconda del Paese: 2 mgL^{-1} in Germania, 6 mgL^{-1} nel Belgio, 10 mgL^{-1} in Svizzera e Austria, 8 mgL^{-1} in Francia e 4 mgL^{-1} in Olanda (Landete *et al.*, 2005b). In ogni caso, l'importanza della problematica per il settore vitivinicolo è evidenziata anche dal fatto che l'Organization International de la Vigne et du Vin (OIV) sta per adottare un *“Codice delle corrette pratiche vitivinicole atte a limitare al massimo la presenza di ammine biogene nei vini”*.

Dal punto di vista microbiologico, la capacità di produrre AB è stata per molto tempo attribuita a batteri lattici appartenenti ai generi *Pediococcus* e *Lactobacillus*, ma più recentemente è stato dimostrato che anche *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente responsabile della FML spontanea ed indotta in vino, è capace di produrre AB quali istamina, cadaverina, putrescina e tiramina, con differenze quali-quantitative in funzione del ceppo considerato (Guerrini *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2008; Rosi

et al., 2009). Infatti, tale capacità è limitata a quei ceppi batterici che sono in possesso dei geni codificanti le decarbossilasi, ovvero gli enzimi che catalizzano la decarbossilazione degli aminoacidi precursori delle singole AB, e che mostrano attiva la loro espressione.

In questo contesto, 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 in modo da contribuire alla tutela della qualità del vino assicurando, non solo un prodotto con determinate caratteristiche organolettiche desiderate, ma anche un prodotto sicuro ai fini della salute del consumatore. Tali strumenti, infatti, renderebbero possibile da un lato, la selezione di ceppi batterici incapaci di formare AB da impiegare come colture *starter* per indurre la FML 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 effetti, l'uso dello *starter*, anche nel caso riesca a condurre con successo la FML, non garantisce che la microflora naturalmente presente in vino non rilasci AB, e pertanto diventa necessario un attento monitoraggio della popolazione microbica presente.

Inoltre, al fine di una corretta gestione della FML per il controllo della produzione di AB, risulta indispensabile conoscere i possibili effetti delle condizioni ambientali e/o dei parametri nutrizionali sul rilascio di tali sostanze in vino da parte di *O. oeni* (Marcobal *et al.*, 2006; Soufleros *et al.*, 2007). La comprensione dei fattori che influenzano la produzione di AB in vino dovrebbe infatti consentire di pianificare gli interventi possibili per limitare il problema e, allo stesso tempo, di individuare le situazioni a rischio che possono compromettere la qualità igienico-sanitaria del prodotto finito.

1.2. Obiettivi del progetto di ricerca

Il progetto di ricerca è stato finalizzato alla messa a punto di strategie di controllo della FML per contribuire alla tutela della qualità del vino includendo non solo le caratteristiche chimiche ed organolettiche ma anche quelle salutistiche. In particolare, ha riguardato lo studio di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre istamina, che è l'ammina che manifesta la maggior tossicità per l'uomo, e putrescina, l'ammina che in genere viene trovata in elevate quantità in vino e che più efficacemente potenzia l'effetto tossico dell'istamina. A tal fine sono stati individuati i seguenti obiettivi:

- a. Sviluppo di un metodo rapido per l'individuazione in vino di ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina
- b. Sviluppo di un metodo in Real-Time PCR per la quantificazione della popolazione di *O. oeni* capace di produrre istamina e putrescina
- c. Definizione di condizioni ambientali e/o parametri nutrizionali che influenzano la formazione di ammine biogene in vino da parte di *O. oeni*

1.3. Articolazione delle attività di ricerca

Le attività di ricerca svolte nel corso dei tre anni sono state articolate secondo diverse fasi operative riportate come sottoazioni nella tabella 1.1. In generale, i metodi di analisi utilizzati hanno compreso:

- metodi molecolari basati sulla Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) sia end-point che in Real-Time
- analisi microbiologiche per la conta batterica e la valutazione qualitativa della produzione di AB
- analisi chimiche in cromatografia liquida (HPLC) per la determinazione quantitativa delle ammine biogene.

Le diverse metodologie analitiche impiegate nei singoli esperimenti vengono descritte in dettaglio nel successivo capitolo parallelamente alla esposizione dei risultati.

Tabella 1.1. Descrizione sintetica ed articolazione delle attività di ricerca previste nel corso dei tre anni del progetto

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	

Capitolo 2. Risultati

I risultati conseguiti sono riportati per singolo anno di attività in funzione degli obiettivi prefissati e secondo le diverse fasi operative previste (Tab. 1.1).

2.1. I anno di attività

L'obiettivo del primo anno di attività di ricerca è stato lo sviluppo di un metodo rapido, mediante la tecnica della Polymerase Chain Reaction (PCR), per l'individuazione di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre in vino istamina e putrescina in seguito alla decarbossilazione dei corrispondenti aminoacidi precursori, istidina e ornitina. Considerato che la capacità di produrre tali AB è limitata ai ceppi di *O. oeni*, che sono in possesso dei geni codificanti l'istidina decarbossilasi (*hdc*) e l'ornitina decarbossilasi (*odc*), l'attività sperimentale si è articolata nelle seguenti fasi operative:

2.2.1. Disegno di *primer* specifici per i geni *hdc* e *odc* e messa a punto dei protocolli di PCR.

2.2.2. Validazione del protocollo di PCR

2.2.3. Sviluppo e validazione di un protocollo di estrazione di DNA da vino e amplificazione dei geni *hdc* e *odc*

2.1.1. Disegno di *primer* specifici per i geni *hdc* e *odc* e messa a punto dei protocolli di PCR.

In questa fase sono stati presi in esame complessivamente 38 isolati di *Oenococcus oeni* appartenenti alla collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (DiBA – Università di Firenze) di cui 18 isolati da vini prodotti in diverse zone enografiche italiane e risultati, nel corso di una precedente indagine, in possesso di una diversa capacità di produrre putrescina e istamina (Guerrini *et al.*, 2002), e 20 isolati da vini che contenevano istamina e putrescina.

Su tutti gli isolati di *O. oeni* sono state condotte le seguenti prove:

- caratterizzazione in mezzo sintetico per valutare la loro capacità di produrre istamina e putrescina
- estrazione del DNA batterico
- reazione di PCR per l'amplificazione del gene *hdc*
- reazioni di PCR per l'amplificazione del gene *odc*

Caratterizzazione in mezzo sintetico degli isolati di *O. oeni*

I ceppi batterici sono stati caratterizzati per la loro capacità di produrre istamina e putrescina, mediante crescita in mezzo sintetico contenente lo specifico aminoacido precursore, ovvero rispettivamente istidina ed ornitina, secondo quanto riportato da Bover-Cid e Holzapfel, 1999. Il metodo, infatti, si basa sul viraggio di un colorante (rosso di bromocresolo) dal giallo al viola in seguito alla produzione di ammine biogene. Nel mezzo contenente come aminoacido precursore istidina, soltanto l'isolato BR14/97 ha determinato il viraggio, mentre nel mezzo contenente ornitina il viraggio è stato riscontrato per gli isolati SC1/00, BR14/97, CA7/1 e NV13/2. Tuttavia, l'analisi mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography), secondo il metodo descritto da Guerrini *et al.*, 2002, del mezzo sintetico ottenuto dopo allontanamento per centrifugazione delle cellule batteriche ha evidenziato che diversi ceppi batterici che non avevano mostrato viraggio sono risultati produttori di istamina o di putrescina, anche se in quantità inferiori rispetto ai ceppi che avevano presentato il viraggio di colore. Probabilmente, la quantità di ammine prodotte non è stata sufficiente a determinare un cambiamento di pH tale da indurre il viraggio di colore. In base ai risultati di questo *screening* è stato possibile individuare ceppi di *O. oeni* potenzialmente produttori di istamina e putrescina e ceppi non produttori (tabella 2.1).

Tabella 2.1. Capacità degli isolati di O.oeni di produrre istamina e putrescina in mezzo sintetico, contenente gli aminoacidi precursori istidina o ornitina, valutata in base al metodo riportato da Bover-Cid e Holzapfel, 1999 (secondo il quale la produzione di ammine determina il viraggio del mezzo da giallo a viola) e mediante analisi in HPLC

Isolato	Viraggio (precursore istidina)	Analisi HPLC (produzione di istamina)	Viraggio (precursore ornitina)	Analisi HPLC (produzione di putrescina)
AG 1/2	-	+	-	-
AG 2/21	-	+	-	-
AG 2/25	-	+	-	-
BM 17/93	-	-	-	-
BM 34/97	-	+	-	-
BM 52/97	-	+	-	-
BR 14/97	+	+	+	+
BR 15/97	-	+	-	+
CA 7/1	-	+	+	+
CA 7/2	-	+	-	-
CD 3/3	-	+	-	-
CD 4/1	-	+	-	-
CH 23/4	-	-	-	-
FB 25/1	-	-	-	-
FB 25/2	-	-	-	-
FB 25/3	-	-	-	-
FB 25/4	-	-	-	-
FB 25/5	-	-	-	-
FB 25/6	-	-	-	-
FB 25/7	-	-	-	-
FB 25/8	-	-	-	-
FB 25/9	-	-	-	-
NV 13/2	-	+	+	+
NV 13/7	-	+	-	-
NV 13/8	-	+	-	-
RP 2/99	-	-	-	-
RP 3/99	-	-	-	-
RP 5/99	-	-	-	-
RP 7/99	-	-	-	-
RP 8/99	-	-	-	-
RP 10/99	-	-	-	-
RP 12/99	-	-	-	-
RP 13/99	-	-	-	-
RP 14/99	-	-	-	-
RP 16/99	-	-	-	-
SC 1/00	-	-	+	+
VR 10/2	-	-	-	-
VR 10/5	-	-	-	-

Estrazione del DNA batterico

Per l'estrazione del DNA di ciascun isolato è stato messo a punto il seguente protocollo:

- Dopo crescita degli isolati in coltura liquida (MRS, Difco, integrato con 2 gL⁻¹ di Tomato Juice a pH 4,8) per una settimana, la biomassa è stata raccolta mediante centrifugazione a 4°C per 10 minuti a 5000 rpm, sottoposta a lavaggio in due fasi successive mediante 1 mL di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂-EDTA, pH 8) e centrifugata per 5 min. a 10.000 rpm.
- la biomassa è stata quindi risospesa in 90 µL di TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na₂-EDTA, pH 8) e, dopo aggiunta di 10 µL di Lysozima (250 mg mL⁻¹), è stata messa a 37°C. per 1 h.
- Successivamente sono stati aggiunti 500 µL di SDS (5%) e dopo aver messo i campioni in ghiaccio, 250 µL di acetato di K a 4°C.
- Trascorsi 10 minuti sono stati ulteriormente addizionati 500 µL di Cloroformio/2-Pentanolio (24:1). Dopo aver centrifugato per 10 minuti a 14.000 rpm è stato trasferito il surnatante in tubini sterili.
- Il DNA è stato quindi precipitato in un volume di isopropanolo e centrifugazione a 14.000 rpm per 10 min.
- Il lavaggio del DNA ottenuto è stato eseguito per tre volte mediante aggiunta 500 µL Etanolo 70% e centrifugazione a 14.000 giri per 10 minuti.
- Dopo completa eliminazione dell'etanolo residuo a 50°C per 30 minuti il DNA è stato risospeso in TE.
- Infine sui campioni è stato effettuato un trattamento con 2 µL di RNase A (1 mgmL⁻¹) ogni 10 µL di TE lasciando ad incubare a 65 °C per minimo 45 min.

Al fine di verificare l'appartenenza del DNA estratto alla specie batterica *O. oeni*, è stata eseguita una reazione di PCR con i seguenti *primer* specie-specifici (Zapparoli *et al.*, 1998):

On1 = (5'TAATGTGGTTCTTGAGGAGAAAAT'3)

On2 = (5'ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT'3)

Per tutti gli isolati saggiati, è stato ottenuto un amplicone delle dimensioni di 1025 bp (Figura 2.1) in accordo con quanto riportato in letteratura, confermando l'appartenza del DNA alla specie *O. oeni*

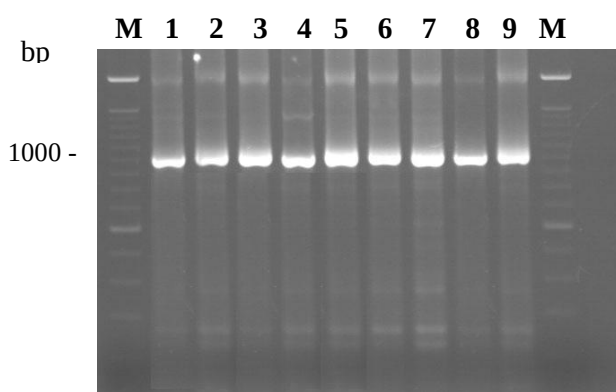


Figura 2.1. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer On1 e On2. Linee da 1 a 9: isolati di *O. oeni*. M = -marker L100.

Messa a punto di protocolli di PCR per l'amplificazione del gene *hdc*

Successivamente, per i ceppi di *O. oeni* risultati potenzialmente produttori di istamina si è proceduto a valutare la presenza del gene *hdc*, che codifica per l'enzima istidina decarbossilasi responsabile della formazione dell'amina, mediante la tecnica di PCR. I ceppi batterici non produttori sono stati utilizzati come controllo negativo.

Per l'amplificazione del **gene *hdc*** sono state utilizzate le seguenti coppie di *primer*:

- CL1mod: (5'CCAGG(TA)ACATTGGTAATGGATA^{3'})
 - JV17HC: (5'AGACCATACACCATAACCTT^{3'})
- } (Landete *et al.*, 2005)
-
- HDC3: (5'GATGGTATTGTTTCKTATGA^{3'})
 - HDC4: (5'CAAACACCAGCATCTTC^{3'})
- } (Coton e Coton, 2005)

Le reazioni di PCR sono state tutte eseguite in un volume finale di 25 μ L contenente 2 μ L di DNA templato, Tampone 10X, MgCl_2 2,5 mM, 1 μ M di ciascun *primer*, 1 mM di dNTP e 1U di PolyTaq (Polymed).

Nelle tabelle 2.2 e 2.3 sono indicate le condizioni di amplificazione impiegate per ciascuna coppia di *primer*.

Tabella 2.2 Protocollo di PCR per la coppia di primer *CL1_{mod}* e *JV17HC*

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	95°C	5 min.	
Denaturazione	94°C	30 sec.	} 40 cicli
Ibridazione <i>primer</i>	48°C	30 sec.	
Estensione	72°C	2 min.	
Completamento	72°C	10 min	
Blocco reazione	4°C	10 min	

Tabella 2.3 Protocollo di PCR per la coppia di primer *HDC3* e *HDC4*

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	95°C	5 min.	
Denaturazione	95°C	45 sec.	} 32 cicli
Ibridazione <i>primer</i>	52°C	45 sec.	
Estensione	72°C	75 sec.	
Completamento	72°C	5 min.	
Blocco reazione	4°C	10 min	

I risultati conseguiti dopo amplificazione con le due coppie di *primer* sono riportati nella tabella 2.4.

Dei 38 isolati di *O. oeni* saggiati, 24 hanno dato, con entrambe le coppie di *primer*, un prodotto di amplificazione delle dimensioni riportate in letteratura per il gene *hdc*, ovvero rispettivamente di 458 bp con i *primer* *CL1_{mod}* e *JV17HC* e 440 bp con i *primer* *HDC3*, *HDC4* (figure 2.2 e 2.3); mentre 6 isolati hanno amplificato soltanto con la prima coppia di *primer* e 8 isolati non hanno mai amplificato.

Tabella 2.4. *Prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazioni di PCR condotte sul DNA estratto dagli isolati di O.oeni con i primer CL1mod, JV17HC (Landete et al., 2005) e con i primers HDC3, HDC4 (Coton e Coton, 2005).*

Isolato	CL1mod, JV17HC (bp)	HDC3, HDC4 (bp)
AG 1/2	458	–
AG 2/21	458	440
AG 2/25	458	440
BM 17/93	458	440
BM 34/97	458	440
BM 52/97	458	440
BR 14/97	458	440
BR 15/97	458	–
CA 7/1	458	440
CA 7/2	458	440
CD 3/3	458	–
CD 4/1	458	440
CH 23/4	458	–
FB 25/1	458	440
FB 25/2	458	440
FB 25/3	458	440
FB 25/4	458	440
FB 25/5	458	440
FB 25/6	–	–
FB 25/7	458	440
FB 25/8	458	440
FB 25/9	458	440
NV 13/2	458	440
NV 13/7	458	440
NV 13/8	458	–
RP 2/99	458	440
RP 3/99	458	440
RP 5/99	–	–
RP 7/99	458	440
RP 8/99	–	–
RP 10/99	–	–
RP 12/99	–	–
RP 13/99	–	–
RP 14/99	–	–
RP 16/99	–	–
SC 1/00	458	440
VR 10/2	458	–
VR 10/5	458	440

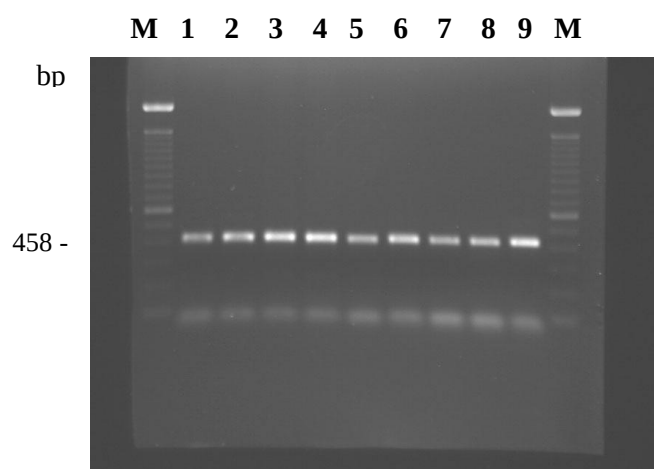


Figura 2.2. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,2%) dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer *CL1_{mod}*, *JV17HC* (Landete et al., 2005). Linee da 1 a 9: isolati di *O. oeni*.
M = marker L100.

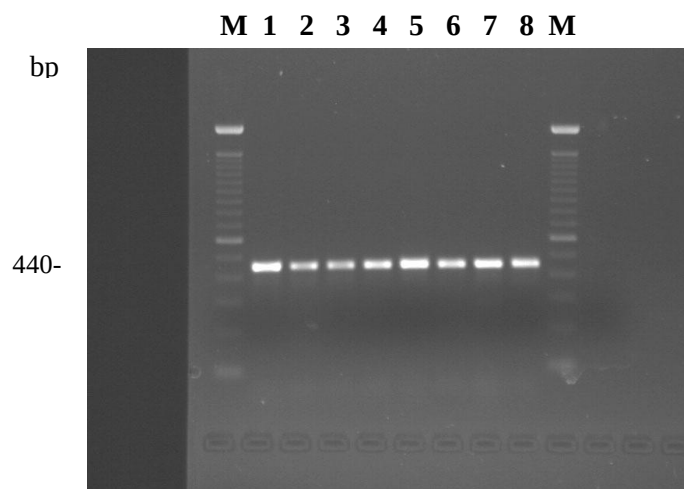


Figura 2.3. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,2%) dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer *HDC3* e *HDC4* (Coton e Coton, 2005). Linee da 1 a 8: isolati di *O. oeni*.
M = marker L100.

Da notare che gli 8 isolati, che non hanno mostrato amplificazione, erano risultati non produttori di istamina in

base all'analisi in HPLC per cui si potrebbe ritenere che non abbiano il gene *hdc*. Tuttavia, dei complessivi 30 ceppi di *O. oeni* risultati positivi con almeno una coppia di *primer* per la presenza del gene *hdc*, e quindi potenzialmente capaci di sintetizzare l'istidina decarbossilasi, 14 sono risultati produttori di istamina e 16 non produttori.

Questa discordanza potrebbe essere spiegata ipotizzando la non espressione del gene *hdc* che determina la mancata sintesi dell'enzima istidina decarbossilasi necessario per la produzione di istamina. Con la finalità di verificare tale ipotesi e tenendo conto anche del fatto che alcuni isolati non avevano mostrato amplificazione con i *primer* HDC3 e HDC4, si è proceduto al sequenziamento di alcuni dei prodotti di amplificazione ottenuti, in modo da valutare l'omologia della sequenza amplificata con quella di sequenze genetiche depositate all'interno di GenBank.

Sequenziamento

Per il sequenziamento alcuni degli ampliconi prodotti nelle reazioni di amplificazione sono stati inviati alla BMR Genomics di Padova. Prima dell'invio dei campioni è stata eseguita una purificazione dei prodotti di PCR e successivamente una quantificazione del DNA da spedire. La purificazione è stata effettuata mediante KIT Nucleo-spin® Extract II. Il principio su cui si basa il Kit prevede che il DNA si leghi ad una apposita membrana di silice in presenza di sali caotropici e di un apposito tampone (NT).

Il DNA così purificato è stato poi quantificato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% (w/v) con marcatore molecolare L100 Biolab che consente anche una quantificazione. Sono stati quindi prelevati 1,5 ng di amplicone ogni 100 bp della sequenza e aggiunti di 6,4 picomoli di *primer* reverse all'interno di una provetta da 200 µL. Dopo essiccazione a 65°C per 20 minuti i campioni così preparati sono stati spediti. Inizialmente, per il sequenziamento, sono stati scelti i campioni degli isolati di

O. oeni BR14/97, SC1/00, CA7/1, CA7/2 e CD4/1, che avevano mostrato amplificazione con entrambe le coppie di *primer* saggiate. Le sequenze ottenute sono state analizzate con BLAST e ricondotte sulla base della loro omologia a sequenze genetiche depositate all'interno di Gen Bank. Dall'allineamento delle sequenze dei frammenti ottenuti con i *primer* CL1_{mod}, JV17HC sui campioni BR14/97, SC1/00, CA7/1, CA7/2 e CD4/1, sono stati ottenuti valori di omologia tra il 99 e il 100%, a dimostrazione dell'identità della regione amplificata nei diversi ceppi. Le sequenze complete sono state allineate e riportate nelle figure da 2.4 a 2.7. Il frammento sequenziato ha riportato una dimensione di 400 bp. Il *primer* di innesco utilizzato nella reazione di sequenziamento è stato CL1_{mod}.

Tuttavia, effettuando un BLAST nelle banche dati del sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> è stato ottenuto che la sequenza non corrisponde al gene *hdc* ma ad una porzione del cDNA del ceppo *O. oeni* PSU-1 corrispondente al gene per la sintesi della proteina fattore di elongazione Ts (EF-TS) nei ribosomi (Figura 2.8).

Score = 719 bits (374), Expect = 0.0					
Identities = 374/374 (100%), Gaps = 0/374 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
1/00SC	1	ATATT	CAGCAACACTCTCACCC	TCGCCTTTAACAAACGGTTGGTTTAATAAAGCAAGTTC	60
BR14/97	1				60
1/00SC	61	ATCAAGAAACTTTCCCAAACGTCCTTCAACAATCTTCTCTTTGATATATTATCAGGCTTATT			120
BR14/97	61				120
1/00SC	121	GCCGAGATCATCAGCCTTCATCTGGATTGATTTTTTCATGCTCGACAACATCTTTTGGAAAC			180
BR14/97	121				180
1/00SC	181	ATCTTCTCTGCTCAAATATTTTCGGTGCTATCGCAGCAATATGCATTGCAATATCTTTGGC			240
BR14/97	181				240
1/00SC	241	AGTTGTAGAATCGCTATTCTCAAGAAGGGTAATAACAGAAATCTGCTCTCCCATGTGGGA			300
BR14/97	241				300
1/00SC	301	ATAGACCCCAAATGTCTGATTATCATTTTTCTCAACAACATTAAACGTCGCAAGGTTAT			360
BR14/97	301				360
1/00SC	361	GGTGTATGGTCTAA	374		
BR14/97	361		374		

Figura 2.4. Allineamento delle sequenze degli isolati di *O. oeni* SC1/00 e BR14/97 ottenute con il *primer* CL1_{mod}. Le sequenze presentano una omologia del 100%

Score = 704 bits (366), Expect = 0.0					
Identities = 373/374 (99%), Gaps = 1/374 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
1/00SC	1	ATATT	CAGCAACACTCTCACCTCGCCTTTAACAAACGGTTGGTTTAATAAAGCAAGTTC	60	
CA7/1	1	-		59	
1/00SC	61	ATCAAGAAACTTTCCCAAACGTCCTTCAACAATCTTCTTTGATATTATCAGGCTTATT	120		
CA7/1	60			119	
1/00SC	121	GCCGAGATCATCAGCCTTCATCTGGATTGATTTTTCATGCTCGACAACATCTTTTGGAAC	180		
CA7/1	120			179	
1/00SC	181	ATCTTCTCTGCTCAAATATTTTCGGTGCTATCGCAGCAATATGCATTGCAATATCTTTGGC	240		
CA7/1	180			239	
1/00SC	241	AGTTGTAGAATCGCTATTCTCAAGAAGGTAATAACAGAAATCTGTCTCCCATGTGGGA	300		
CA7/1	240			299	
1/00SC	301	ATAGACCCCAAATGTCTGATTATCATTTTCTCAACAACATTAAACGTCGCAAGGTTAT	360		
CA7/1	300			359	
1/00SC	361	GGTGATGGTCTAA	374		
CA7/1	360		373		

Figura 2.5. Allineamento delle sequenze di SC1/00 e CA7/1 ottenute con il primer $CL1_{mod}$. Le sequenze presentano una omologia del 99%

Score = 715 bits (372), Expect = 0.0					
Identities = 372/372 (100%), Gaps = 0/372 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
1/00SC	1	ATATT	CAGCAACACTCTCACCTCGCCTTTAACAAACGGTTGGTTTAATAAAGCAAGTTC	60	
CA7/2	2			61	
1/00SC	61	ATCAAGAAACTTTCCCAAACGTCCTTCAACAATCTTCTTTGATATTATCAGGCTTATT	120		
CA7/2	62			121	
1/00SC	121	GCCGAGATCATCAGCCTTCATCTGGATTGATTTTTCATGCTCGACAACATCTTTTGGAAC	180		
CA7/2	122			181	
1/00SC	181	ATCTTCTCTGCTCAAATATTTTCGGTGCTATCGCAGCAATATGCATTGCAATATCTTTGGC	240		
CA7/2	182			241	
1/00SC	241	AGTTGTAGAATCGCTATTCTCAAGAAGGTAATAACAGAAATCTGTCTCCCATGTGGGA	300		
CA7/2	242			301	
1/00SC	301	ATAGACCCCAAATGTCTGATTATCATTTTCTCAACAACATTAAACGTCGCAAGGTTAT	360		
CA7/2	302			361	
1/00SC	361	GGTGATGGTCT	372		
CA7/2	362		373		

Figura 2.6. Allineamento delle sequenze di SC1/00 e CA7/2 ottenute con il primer $CL1_{mod}$. Le sequenze presentano una omologia del 100%.

Score = 719 bits (374), Expect = 0.0					
Identities = 374/374 (100%), Gaps = 0/374 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
1/00SC	1	ATATT	CAGCAACACTCTCACCCCTCGCCTTTAACAAACGGTTGGTTTAAATAAAGCAAGTTC	60	
CD 4/1	1			60	
1/00SC	61	ATCAAGAAACTTTCCCAAACGTCCTTCAACAATCTTCTCTTTGATATTATCAGGCTTATT	120		
CD 4/1	61			120	
1/00SC	121	GCCGAGATCATCAGCCTTCATCTGGATTGATTTTTCATGCTCGACAACATCTTTTGGAAAC	180		
CD 4/1	121			180	
1/00SC	181	ATCTTCTCTGCTCAAATATTTTCGGTGCTATCGCAGCAATATGCATTGCAATATCTTTGGC	240		
CD 4/1	181			240	
1/00SC	241	AGTTGTAGAATCGCTATTCTCAAGAAGGGTAATAACAGAAATCTGTCTCCCATGTGGGA	300		
CD 4/1	241			300	
1/00SC	301	ATAGACCCCAAATGTCTGATTATCATTTTTTCTCAACAACATTAAACGTCGCAAGGTTAT	360		
CD 4/1	301			360	
1/00SC	361	GGTGTATGGTCTAA	374		
CD 4/1	361		374		

Figura 2.7. Allineamento delle sequenze di SC1/00 e CD4/1 ottenute con il primer $CL1_{mod}$. Le sequenze presentano una omologia del 100%.

Score = 665 bits (360), Expect = 0.0					
Identities = 360/360 (100%), Gaps = 0/360 (0%)					
Strand=Plus/Minus					
CD4/1	1	ATATT	CAGCAACACTCTCACCCCTCGCCTTTAACAAACGGTTGGTTTAAATAAAGCAAGTTC		
PSU-1	908578	ATATT	CAGCAACACTCTCACCCCTCGCCTTTAACAAACGGTTGGTTTAAATAAAGCAAGTTC		
CD4/1	61	ATCAAGAAACTTTCCCAAACGTCCTTCAACAATCTTCTCTTTGATATTATCAGGCTTATT			
PSU-1	908518	ATCAAGAAACTTTCCCAAACGTCCTTCAACAATCTTCTCTTTGATATTATCAGGCTTATT			
CD4/1	121	GCCGAGATCATCAGCCTTCATCTGGATTGATTTTTCATGCTCGACAACATCTTTTGGAAAC			
PSU-1	908458	GCCGAGATCATCAGCCTTCATCTGGATTGATTTTTCATGCTCGACAACATCTTTTGGAAAC			
CD4/1	181	ATCTTCTCTGCTCAAATATTTTCGGTGCTATCGCAGCAATATGCATTGCAATATCTTTGGC			
PSU-1	908398	ATCTTCTCTGCTCAAATATTTTCGGTGCTATCGCAGCAATATGCATTGCAATATCTTTGGC			
CD4/1	241	AGTTGTAGAATCGCTATTCTCAAGAAGGGTAATAACAGAAATCTGTCTCCCATGTGGGA			
PSU-1	908338	AGTTGTAGAATCGCTATTCTCAAGAAGGGTAATAACAGAAATCTGTCTCCCATGTGGGA			
CD4/1	301	ATAGACCCCAAATGTCTGATTATCATTTTTTCTCAACAACATTAAACGTCGCAAGGTTAT			
PSU-1	908278	ATAGACCCCAAATGTCTGATTATCATTTTTTCTCAACAACATTAAACGTCGCAAGGTTAT			

Figura 2.8. Allineamento della sequenza nucleotica dell'isolato CD4/1 in *ncbi*. Parte del gene del fattore di elongazione Ts "Translation elongation factor Ts" (EF-Ts) presente sul cromosoma di *O.oeni* PSU-1.

Dal sequenziamento effettuato sui prodotti di amplificazione ottenuti con i *primer* HDC3, HDC4 dal DNA degli isolati BR14/97, SC1/00, CA7/1, CA7/2 e AG1/2 è stato osservato come tutte le sequenze abbiano fra loro una omologia prossima al 100%. I risultati degli allineamenti sono stati riportati nelle figure 2.9, 2.10, 2.11 e 2.12. Analogamente a quanto effettuato con le sequenze ottenute con CL1_{mod} è stato fatto il BLAST per individuare le sequenze depositate con il più alto livello di affinità.

Il risultato atteso non è stato confermato neppure per la coppia di *primer* HDC3, HDC4.

In figura 2.13 è stato riportato l'allineamento della sequenza di *O.oeni* CA7/1 con quella del gene per l'rRNA 23S presente nel DNA di *O.oeni* PSU-1.

Score = 758 bits (394), Expect = 0.0				
Identities = 396/397 (99%), Gaps = 0/397 (0%)				
Strand=Plus/Plus				
CA7/1	1	TTGTTGAGACAGCGCCCAAATCATTACGCCTTTCATGCGGGTCGGAACCTTACCCGACAAG	60	
BR14/97	2		61	
CA7/1	61	GAATTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCGTTCACTGGGGCTTCAATTAA	120	
BR14/97	62		121	
CA7/1	121	GACCTTCGCCGAAGCTAAGTCCTCCTTTTAACCTTCCAGCACTGGGCAGGCGTCAGCCCC	180	
BR14/97	122		181	
CA7/1	181	TATACTTCATCTTACGATTTTGCAGAAACCTGTGTTTTTGATAAACAGTTGTTTGGGCCT	240	
BR14/97	182		241	
CA7/1	241	ATTTGCTGCGGCTGGTATAAAACCAGCAGTCCTTCTCCGAAGTTACGGACTCATTTTGC	300	
BR14/97	242		301	
CA7/1	301	AGAGTTCCTTAACAATAGTTCACTCGCTCACCTTAGTGTTCTCCACTTGAGTACCTGTGT	360	
BR14/97	302	C.....	361	
CA7/1	361	CGGTTTGCGGTACGGGCAATATTTCTTCATACGAAA	397	
BR14/97	362		398	

Figura 2.9. Allineamento delle sequenze di CA7/1 e BR14/97 ottenute con il primer HDC4. Le sequenze presentano una omologia del 99%

Score = 756 bits (393), Expect = 0.0				
Identities = 393/393 (100%), Gaps = 0/393 (0%)				
Strand=Plus/Plus				
CA7/1	1	TTGTTGAGACAGCGCCCAAATCATTACGCCTTTCATGCGGGTCGGAACCTACCCGACAAG	60	
CA7/2	4		63	
CA7/1	61	GAATTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTCACTGGGGCTTCAATTAA	120	
CA7/2	64		123	
CA7/1	121	GACCTTCGCCGAAGCTAAGTCCTCCTTTTAACCTTCCAGCACTGGGCAGGCGTCAGCCCC	180	
CA7/2	124		183	
CA7/1	181	TATACTTCATCTTACGATTTTGCAGAAACCTGTGTTTTGATAAACAGTTGTTTGGGCCT	240	
CA7/2	184		243	
CA7/1	241	ATTTGCTGCGGCTGGTATAAAACCAGCAGTCCTTCTTCCGAAGTTACGGACTCATTTTGC	300	
CA7/2	244		303	
CA7/1	301	AGAGTTCCTTAACAATAGTTCACTCGCTCACCTTAGTGTTCTCCACTTGAGTACCTGTGT	360	
CA7/2	304		363	
CA7/1	361	CGGTTTGCGGTACGGGCAATATTTCTTCATAC	393	
CA7/2	364		396	

Figura 2.10. Allineamento delle sequenze di CA7/1 e CA7/2 ottenute con il primer HDC4. Le sequenze presentano una omologia del 100%

Score = 756 bits (393), Expect = 0.0				
Identities = 393/393 (100%), Gaps = 0/393 (0%)				
Strand=Plus/Plus				
CA7/1	1	TTGTTGAGACAGCGCCCAAATCATTACGCCTTTCATGCGGGTCGGAACCTACCCGACAAG	60	
AG1/2	3		62	
CA7/1	61	GAATTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTCACTGGGGCTTCAATTAA	120	
AG1/2	63		122	
CA7/1	121	GACCTTCGCCGAAGCTAAGTCCTCCTTTTAACCTTCCAGCACTGGGCAGGCGTCAGCCCC	180	
AG1/2	123		182	
CA7/1	181	TATACTTCATCTTACGATTTTGCAGAAACCTGTGTTTTGATAAACAGTTGTTTGGGCCT	240	
AG1/2	183		242	
CA7/1	241	ATTTGCTGCGGCTGGTATAAAACCAGCAGTCCTTCTTCCGAAGTTACGGACTCATTTTGC	300	
AG1/2	243		302	
CA7/1	301	AGAGTTCCTTAACAATAGTTCACTCGCTCACCTTAGTGTTCTCCACTTGAGTACCTGTGT	360	
AG1/2	303		362	
CA7/1	361	CGGTTTGCGGTACGGGCAATATTTCTTCATAC	393	
AG1/2	363		395	

Figura 2.11. Allineamento delle sequenze di CA7/1 e AG1/2 ottenute con il primer HDC4. Le sequenze presentano una omologia del 100%

Score = 756 bits (393), Expect = 0.0			
Identities = 393/393 (100%), Gaps = 0/393 (0%)			
Strand=Plus/Plus			
CA7/1	1	TTGTTGAGACAGCGCCCAAATCATTACGCCTTTCATGCGGGTCGGAACCTACCCGACAAG	60
1/00SC	3		62
CA7/1	61	GAATTTGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTCACTGGGGCTTCAATTAA	120
1/00SC	63		122
CA7/1	121	GACCTTCGCCGAAGCTAAGTCCTCCTTTTAACCTTCCAGCACTGGGCAGGCGTCAGCCCC	180
1/00SC	123		182
CA7/1	181	TATACTTCATCTTACGATTTTGCAGAAACCTGTGTTTTGATAAACAGTTGTTGGGCCT	240
1/00SC	183		242
CA7/1	241	ATTGCTGCGGCTGGTATAAAACCAGCAGTCCTTCTCCGAAGTTACGGACTCATTTTGC	300
1/00SC	243		302
CA7/1	301	AGAGTTCCTTAACAATAGTTCACTCGCTCACCTTAGTGTTCTCCACTTGTAGTACCTGTGT	360
1/00SC	303		362
CA7/1	361	CGGTTTGCGGTACGGGCAATATTTCTTCATAC	393
1/00SC	363		395

Figura 2.12. Allineamento delle sequenze di CA7/1 e SC1/00 ottenute con il primer HDC4. Le sequenze presentano una omologia del 100%

Score = 743 bits (402), Expect = 0.0			
Identities = 404/405 (99%), Gaps = 0/405 (0%)			
Strand=Plus/Minus			
Query	7	ACCGAGTCTATTGTTGAGACAGCGCCCAAATCATTACGCCTTTCATGCGGGTCGGAACCT	
Sbjct	620261	ACCGAGTCTATTGTTGAGACAGCGCCCAAATCATTACGCCTTTCATGCGGGTCGGAACCT	
Query	67	ACCCGACAAGGAATTTGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTCACTGGGG	
Sbjct	620201	ACCCGACAAGGAATTTGCTACCTTAGGACCGTTATAGTTACGGCCGCCGTTCACTGGGG	
Query	127	CTTCAATTAAGACCTTCGCCGAAGCTAAGTCCTCCTTTTAACCTTCCAGCACTGGGCAGG	
Sbjct	620141	CTTCAATTAAGACCTTCGCCGAAGCTAAGTCCTCCTTTTAACCTTCCAGCACTGGGCAGG	
Query	187	CGTCAGCCCTTATACTTCATCTTACGATTTTGCAGAAACCTGTGTTTTGATAAACAGTT	
Sbjct	620081	CGTCAGCCCTTATACTTCATCTTACGATTTTGCAGAAACCTGTGTTTTGATAAACAGTT	
Query	247	GTTTGGGCCTATTGCTGCGGCTGGTATAAAACCAGCAGTCCTTCTCCGAAGTTACGGA	
Sbjct	620021	GTTTGGGCCTATTGCTGCGGCTGGTATAAAACCAGCAGTCCTTCTCCGAAGTTACGGA	
Query	307	CTCATTTTGCAGAGTTCCTTAACAATAGTTCACTCGCTCACCTTAGTGTTCTCCACTTGA	
Sbjct	619961	CTCATTTTGCAGAGTTCCTTAACAATAGTTCACTCGCTCACCTTAGTGTTCTCCACTTGA	
Query	367	GTACCTGTGTCGGTTTGCGGTACGGGCAATATTTCTTCATACGA	411
Sbjct	619901	GTACCTGTGTCGGTTTGCGGTACGGGCAATATTTCTTCATACGA	619857

Figura 2.13. Allineamento della sequenza nucleotica dell'isolato *O.oeni* CA7/1 in ncbi. Parte del gene per l'RNA ribosomiale 23S presente sul cromosoma di *O.oeni* PSU-1.

In conclusione, i risultati del sequenziamento dei frammenti di amplificazione ottenuti con entrambe le coppie di *primer* dimostrano che la regione che viene amplificata non corrisponde, almeno per i ceppi saggiati, al gene *hdc*, ma a regioni diverse del genoma di *O. oeni*, diversamente da quanto riportato da alcuni Autori in letteratura (Landete *et al.*, 2007). Tuttavia, va rilevato che altri Autori hanno conseguito risultati contrastanti con diverse coppie di *primer*, e che, inoltre, è stato riportato che il gene *hdc* può essere localizzato, in alcuni ceppi di *O. oeni*, su DNA plasmidico che risulta instabile per i ceppi mantenuti in condizioni di laboratorio per cui ceppi HDC-positivi sono convertiti in ceppi HDC-negativi (Lucas *et al.*, 2008).

In ogni caso, tenendo conto dei risultati ottenuti, nel secondo anno di attività, si è proceduto all'impiego di altri *primer* di recente pubblicazione (Lucas *et al.*, 2008).

Messa a punto di protocolli di PCR per l'amplificazione del gene *odc*

Analogamente, per i ceppi di *O. oeni* risultati potenzialmente produttori di putrescina si è proceduto a valutare la presenza del gene *odc*, che codifica per l'enzima ornitina decarbossilasi responsabile della formazione dell'ammina, mediante la tecnica di PCR. I ceppi batterici non produttori sono stati utilizzati come controllo negativo.

Per l'amplificazione del **gene *odc*** sono state utilizzate le seguenti coppie di *primer*:

- **OdR:** (5'CCGTTCAACAACCTGTTTGGCA3')
 - **OdF:** (5'CATCAAGGTGGACAATATTTCCG3') } (Granchi *et al.*, 2005)

- **3** (5'GTNTTYAAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT3')
 - **16** (5'TACRCARAATACTCCNGGNGGRTANGG3') } (Marcobal *et al.*, 2005)

Le reazioni di PCR sono state tutte eseguite in una reazione di 25 µL contenente 2 µL di DNA template,

Tampone 10X, MgCl_2 2.5 mM, 1 μM di ciascun primer, 1 mM di dNTP e 1U di PolyTaq (Polymed).

Nella tabella 2.5 sono indicate le condizioni di amplificazione impiegate per la coppia di *primer* riportata da Granchi *et al.*, 2005, mentre per la seconda coppia di *primer* sono state adottate le condizioni riportate da Marcobal., *et al.*, 2005.

Tabella 2.5. Protocollo di PCR per la coppia di primer OdR e OdF

FASE	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale	95°C	10 min.
Denaturazione	95°C	30 sec.
Ibridazione primers	54°C	30 sec.
Estensione	72°C	2 min.
Completamento	72°C	10 min.
Blocco reazione	4°C	10 min

} 27 cicli

Dato che con la coppia di *primer* 3, 16 nessun isolato ha dato un prodotto di amplificazione, nella tabella 2.6 sono riportati i risultati conseguiti dopo amplificazione con la coppia di *primer* OdR e OdF. Dei 38 isolati *O. oeni* saggiati, 8 hanno dato un prodotto di amplificazione delle dimensioni riportate in letteratura per il gene *odc*, ovvero di 500 bp (Figura 2.14).

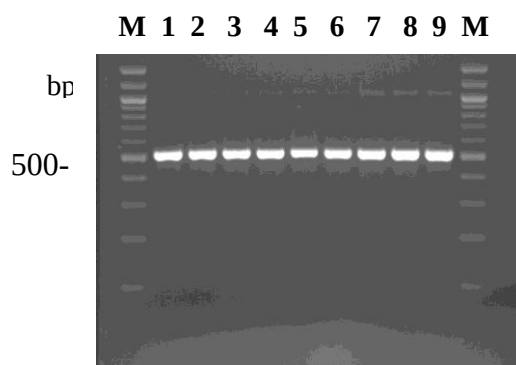


Figura 2.14. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,2%) dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer OdR e OdF (Granchi *et al.*, 2005). Linee da 1 a 9: isolati di *O. oeni*. M = marker L100.

Tabella 2.6. *Prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazioni di PCR condotte sul DNA estratto dagli isolati di O.oeni con i primer OdR e OdF (Granchi et al., 2005)*

Isolato	OdR e OdF (bp)
AG 1/2	–
AG 2/21	–
AG 2/25	–
BM 17/93	500
BM 34/97	500
BM 52/97	500
BR 14/97	500
BR 15/97	–
CA 7/1	500
CA 7/2	–
CD 3/3	–
CD 4/1	–
CH 23/4	–
FB 25/1	–
FB 25/2	–
FB 25/3	–
FB 25/4	500
FB 25/5	–
FB 25/6	–
FB 25/7	–
FB 25/8	–
FB 25/9	–
NV 13/2	500
NV 13/7	–
NV 13/8	–
RP 2/99	–
RP 3/99	–
RP 5/99	–
RP 7/99	–
RP 8/99	–
RP 10/99	–
RP 12/99	–
RP 13/99	–
RP 14/99	–
RP 16/99	–
SC 1/00	500
VR 10/2	–
VR 10/5	–

Confrontando i dati dell'amplificazione con quelli ottenuti dopo analisi in HPLC (Tab. 2.1), si evidenzia che 5 degli 8 isolati che hanno mostrato un prodotto di amplificazione, e quindi potenzialmente positivi per la presenza del gene *odc*, sono risultati produttori di putrescina.

Per confermare che il prodotto di amplificazione corrispondesse al gene *odc* si è proceduto al sequenziamento dei prodotti di amplificazione ottenuti per gli isolati *O.oeni* SC1/00, CA7/1 e FB25/4, in modo da valutare l'omologia della sequenza amplificata con quella di sequenze genetiche depositate all'interno di Gen Bank -ncbi.

La preparazione dei campioni per il sequenziamento è stata effettuata secondo la procedura riportata in precedenza (vedi pag. 18).

Gli allineamenti tra le sequenze ottenute dai prodotti di amplificazione per l'*odc* con i *primers*, OdF e OdR per i 4 isolati presi in esame hanno mostrato valori di omologia pari al 99% (Figure 2.15 e 2.16). L'unica differenza riscontrata tra le sequenze nucleotidiche è stata quella relativa alla presenza di un "gap" di una base di adenina (A) in posizione 40 sulla sequenza di *O.oeni* SC1/00.

L'allineamento con le sequenze depositate nella banca dati di ncbi ha fornito dei valori di omologia con il ceppo di *Oenococcus oeni* BIFI-83 (Marcobal *et al.*, 2004) pari al 98% (Figura 2.17), confermando l'appartenenza delle regioni geniche sequenziate a quella del gene *odc*.

I risultati conseguiti evidenziano che la presenza del gene codificante per la decarbossilasi specifica per una ammina biogena non sempre è direttamente correlato alla sua produzione, in quanto la sua espressione potrebbe essere influenzata da diversi fattori ambientali e/o nutrizionali.

Score = 890 bits (463), Expect = 0.0					
Identities = 479/482 (99%), Gaps = 2/482 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
1/00SC	1	TTATAACTTTTATGGGGAAA-TATTTTTCGATCTGACATTGTGAATGCCGATGTTGATT	59		
CA 7/1	3	 A	62		
1/00SC	60	AGGCGATCTTTTAATTCATGAAGGACCAGCAATGGATGCTGAAAAACATGCAGCACGAGT	119		
CA 7/1	63		122		
1/00SC	120	GTTCAATGCTGACAAAACATATTTTGTATGAATGGAACCACAACCTCTAATAACATTGC	179		
CA 7/1	123		182		
1/00SC	180	CATTACGGCCGCTGTTGCACCAAGGTGATTTGGTATTATTTGATCGTAATAATCATAAGTC	239		
CA 7/1	183		242		
1/00SC	240	AGTATACAATGCAGCTTTGGTACAAGCAGGTGGCAGACCATTTTATTAGAGACATCTCG	299		
CA 7/1	243		302		
1/00SC	300	TGATTCCACGGATTTATTGGTGGCATCTACTCTAAAGATTTTGATGAAAAGTCTATTTCG	359		
CA 7/1	303	 T	362		
1/00SC	360	TGAAAAGATTGCAAAAGTTGACCCTGAAAAAGCTAAGGCTAAAAGACCATTTCAGATTGGC	419		
CA 7/1	363		422		
1/00SC	420	TGTTATTCAATTAGGAACTTATGATGGCACAATTTATAATGCCAAACAAGTTGTTTGAAC	479		
CA 7/1	423	 -	481		
1/00SC	480	GG	481		
CA 7/1	482	..	483		

Figura 2.15. Allineamento delle sequenze di SC1/00 e CA7/1 ottenute con il primer OdF. Le sequenze presentano una omologia del 99%.

Score = 910 bits (473), Expect = 0.0					
Identities = 480/481 (99%), Gaps = 1/481 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
1/00SC	1	TTATAACTTTTATGGGGAAA-TATTTTTCGATCTGACATTGTGAATGCCGATGTTGATT	59		
FB25/4	3	 A	62		
1/00SC	60	AGGCGATCTTTTAATTCATGAAGGACCAGCAATGGATGCTGAAAAACATGCAGCACGAGT	119		
FB25/4	63		122		
1/00SC	120	GTTCAATGCTGACAAAACATATTTTGTATGAATGGAACCACAACCTCTAATAACATTGC	179		
FB25/4	123		182		
1/00SC	180	CATTACGGCCGCTGTTGCACCAAGGTGATTTGGTATTATTTGATCGTAATAATCATAAGTC	239		
FB25/4	183		242		
1/00SC	240	AGTATACAATGCAGCTTTGGTACAAGCAGGTGGCAGACCATTTTATTAGAGACATCTCG	299		
FB25/4	243		302		
1/00SC	300	TGATTCCACGGATTTATTGGTGGCATCTACTCTAAAGATTTTGATGAAAAGTCTATTTCG	359		
FB25/4	303		362		
1/00SC	360	TGAAAAGATTGCAAAAGTTGACCCTGAAAAAGCTAAGGCTAAAAGACCATTTCAGATTGGC	419		
FB25/4	363		422		
1/00SC	420	TGTTATTCAATTAGGAACTTATGATGGCACAATTTATAATGCCAAACAAGTTGTTTGAAC	479		
FB25/4	423		482		
1/00SC	480	G	480		
FB25/4	483	.	483		

Figura 2.16. Allineamento delle sequenze di SC1/00 e FB25/4 ottenute con il primer OdF. Le sequenze presentano una omologia del 99%.

CA7/1	9	GGGA-GAG-ATTTTATAACTTTTATGGGGAAAATATTTTTCGATCTGACATTGTAATGC	66
BIFI83	9348	GGGACGAGAATTTTATAACTTTTATGGGGAAAATATTTTTCGATCTGACATTGTAATGC	9407
CA7/1	67	CGATGTTGATTTAGGCGATCTTTTAATTCATGAAGGACCAGCAATGGATGCTGAAAAACA	126
BIFI83	9408	CGATGTTGATTTAGGCGATCTTTTAATTCATGAAGGACCAGCAATGGATGCTGAAAAACA	9467
CA7/1	127	TGCAGCACGAGTGTTCAATGCTGACAAAACATATTTTGTATGAATGGAACCACAACCTTC	186
BIFI83	9468	TGCAGCACGAGTGTTCAATGCTGACAAAACATATTTTGTATGAATGGAACCACAACCTTC	9527
CA7/1	187	TAATAACATTGCCATTACGGCCGCTGTTGCACCAGGTGATTTGGTATTATTTGATCGTAA	246
BIFI83	9528	TAATAACATTGCCATTACGGCCGCTGTTGCACCAGGTGATTTGGTATTATTTGATCGTAA	9587
CA7/1	247	TAATCATAAGTCAGTATACAATGCAGCTTTGGTACAAGCAGGTGGCAGACCATTTTATTT	306
BIFI83	9588	TAATCATAAGTCAGTATACAATGCAGCTTTGGTACAAGCAGGTGGCAGACCAGTTTATTT	9647
CA7/1	307	AGAGACATCTCGTGATTCCTACGGATTATTGGTGGCATCTACTCTAAAGATTTTGATGA	366
BIFI83	9648	AGAGACATCTCGTGATTCCTACGGATTATTGGTGGCATCTACTCTAAAGATTTTGATGA	9707
CA7/1	367	AAAGTCTATTCGTGAAAAGATTGCAAAAAGTTGACCCTGAAAAGCTAAGGCTAAAAGACC	426
BIFI83	9708	AAAGTCTATTCGTGAAAAGATTGCAAAAAGTTGACCCTGAAAAGCTAAGGCTAAGAGACC	9767
CA7/1	427	ATTGAGATTGGCTGTTATTCAATTAGGAACCTATGATGGCACAATTTATAATGCCAAACA	486
BIFI83	9768	ATTGAGATTGGCTGTTATTCAATTAGGAACCTATGATGGCACAATTTATAATGCCAAACA	9827
CA7/1	487	AGTTGTTTGAACG	499
BIFI83	9828	AGTTGTT-GAACG	9839

Figura 2.17. Risultato dell'allineamento della sequenza nucleotidica dell'isolato CA 7/1 in ncbi. Parte del gene *odc* di *O.oeni* BIFI-83.

Bioinformatica

Per la visualizzazione delle sequenze è stato utilizzato il programma open source “Fich tv” (www.geospiza.com/finchtv/).

Per l'allineamento e il confronto dell'omologie con le sequenze depositate in GenBank, è stato utilizzato il software al sito internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>.

Infine, mediante il programma OligoAnalyzer1.2 sono stati calcolati i parametri termodinamici dei *primer* utilizzati nelle reazioni di PCR. Per lo studio di nuove sequenze oligonucleotiche per l'amplificazione dei geni *hdc* e *odc* è stato utilizzato il programma presente nel sito internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>.

2.1.2. Validazione del protocollo di PCR

In questa fase è stata valutata la specificità delle coppia di *primer* OdR e OdF che hanno amplificato il gene *odc* in precedenza. A tal fine sono state effettuate prove di estrazione del DNA totale da co-colture liquide di ceppi di *O. oeni* (che avevano dato amplificazione del gene *odc*) con altre specie o generi di batteri lattici presenti nel vino (*Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp.) e con il lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

La prova è stata allestita formando le seguenti co-colture:

- co-cultura 1 (CO-1): con *O.oeni* CA7/1 *Lactobacillus plantarum* DSM 20174^T, *Lactobacillus brevis* DSM 20054^T, *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343^T, un *Pediococcus* spp. (PS411) e il lievito *Saccharomyces cerevisiae* DiBA 230 della collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie.
- co-cultura 2 (CO-2): è stata formata con gli stessi ceppi di microrganismi elencati precedentemente sostituendo però l'isolato *O.oeni* CA7/1 con *O.oeni* SC1/00.
- co-cultura 3 (CO-3): non sono stati inoculati batteri della specie *O.oeni* ma solo i batteri dei generi *Lactobacillus* spp, *Pediococcus* spp e *Leuconostoc* spp, e il lievito *Saccharomyces* spp.

L'estrazione del DNA dalle co-colture è stata effettuata mettendo a confronto i protocolli di estrazione previsti per due Kit commerciali: Nucleo-Spin e Power Soil (Macherey-Nagel, Italia). I risultati dell'amplificazione dell'*odc* sono riportati in figura 2.18. Dall'immagine è possibile osservare come solo per le due co-colture CO-1 e CO-2, in cui erano presenti gli isolati di *O. oeni* CA7/1 e SC1/00 produttori di putrescina, sia stato possibile ottenere l'amplificazione dell'*odc*, mentre per la terza co-cultura non è stato ottenuto alcun prodotto di amplificazione, a conferma della specificità del protocollo di PCR utilizzato.

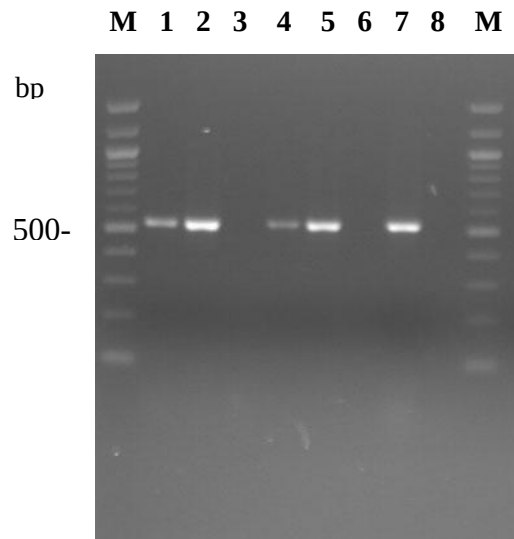


Figura 2.18. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio (1,2%) dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer OdR e OdF (Granchi et al., 2005) con DNA estratto da co-culture.

Linea 1: Co-1 estrazione kit Power Soil-O.oeni CA7/1 *Lb. plantarum* DSM 20174^T, *Lb. brevis* DSM 20054^T, *L. mesenteroides* DSM 20343^T, *Pediococcus* spp. (PS4 11) e lievito *S. cerevisiae* DiBA 230;

Linea 2: Co-2 estrazione kit Power Soil- O.oeni SC1/00, *Lb. plantarum* DSM 20174^T, *Lb. brevis* DSM 20054^T, *L. mesenteroides* DSM 20343^T, *Pediococcus* spp. (PS4 11) e il lievito *S. cerevisiae* DiBA 230.

Linea 3: Co-3 estrazione kit Power Soil-Lb. *plantarum* DSM 20174^T, *Lb. brevis* DSM 20054^T, *L. mesenteroides* DSM 20343^T, *Pediococcus* spp. (PS411) e lievito *S. cerevisiae* DiBA 230.

Linea 4: Co-1 estrazione kit NucleoSpin-O.oeni CA7/1 *Lb. plantarum* DSM 20174^T, *Lb. brevis* DSM 20054^T, *L. mesenteroides* DSM 20343^T, *Pediococcus* spp. (PS4 11) e il lievito *S. cerevisiae* DiBA 230.

Linea 5: Co-2 estrazione NucleoSpin- O.oeni SC1/00, *Lb. plantarum* DSM 20174^T, *Lb. brevis* DSM 20054^T, *L. mesenteroides* DSM 20343^T, *Pediococcus* spp. (PS4 11) e il lievito *S. cerevisiae* DiBA 230.

Linea 6: Co-3 estrazione kit NucleoSpin-Lb. *plantarum* DSM 20174^T, *Lb. brevis* DSM 20054^T, *L. mesenteroides* DSM 20343^T, *Pediococcus* spp. (PS4 11) e il lievito *S. cerevisiae* DiBA 230.

Linea 7: controllo positivo. Linea 8: controllo negativo. Marker L100 Biolabs

2.1.3. Sviluppo e validazione di un protocollo di estrazione di DNA da vino e amplificazione dei geni *hdc* e *odc*

In questa terza fase, l'attività è stata rivolta allo sviluppo di una metodica di estrazione di DNA da vino e alla successiva verifica del funzionamento della reazione di amplificazione, dato che è noto che, varie sostanze presenti in vino, quali ad esempio i polifenoli, interferiscono con la reazione di PCR inibendola o diminuendone l'efficienza (Lawson *et al.*, 1997, Zapparoli *et al.*, 1998).

Per l'estrazione del DNA da vino sono state saggiate le rese con due diversi Kit disponibili in commercio:

- Nucleo Spin® Food (Macherey–Nagel)
- PowerSoil™ DNA Isolation Sample Kit (Macherey–Nagel)

Il Kit NucleoSpin® Food agisce grazie all'azione di composti chimici, utilizzando tamponi contenenti sali caotropici, agenti denaturanti e detergenti che lisano le cellule. Successivamente i detriti cellulari vengono lavati, mentre, il DNA viene legato ad un apposito tampone al fine di creare le condizioni ottimali per il suo ancoraggio ad una colonnina munita di membrana di silice. Dopo lavaggio con un tampone di eluizione è quindi possibile recuperare il DNA pronto per le successive applicazioni.

Il Kit (PowerSoil™ DNA Isolation Sample Kit) si differenzia dal precedente nelle fasi di lisi e estrazione del DNA che avvengono grazie all'azione meccanica di piccole palline fornite nel Kit e a quella fisica del calore. Il DNA, anche in questo caso, viene trattenuto all'interno di una colonnina munita di membrana di silice e successivamente eluito con un apposito tampone.

Inizialmente, sono state condotte prove su vino inoculato con cellule di *O.oeni* dopo filtrazione su membrana a 0,45 µm, effettuando le estrazioni secondo i protocolli consigliati dai produttori dei Kit. Tuttavia, non è stato possibile apprezzare una efficace capacità estrattiva e, soprattutto, le reazioni di amplificazione non hanno dato risultati positivi.

Sono state, quindi, apportate due tipologie di ottimizzazione del metodo: la prima volta a migliorare l'efficienza della PCR; la seconda ad ottimizzare l'estrazione.

Efficienza delle reazioni di PCR ed ottimizzazione

Allo scopo di ottenere il miglior risultato nell'amplificazione del DNA estratto da vino, sono state condotte delle prove per valutare l'efficienza della reazione di PCR secondo due metodi:

- Il primo metodo ha previsto un'ottimizzazione della reazione valutando l'azione ottenuta grazie all'introduzione di Albumina Serica Bovina (BSA) (10mg mL^{-1} - Sigma) o Skim Milk (0,3% w/v) (Arbeli e Fuentes, 2007) e formammide a due diverse concentrazioni 0,5 % (v/v) e 1% (v/v) (Araque *et al.*, 2008; Sakar *et al.*, 1990).
- Il secondo metodo ha previsto un trattamento dell'estratto come riportato da Jara *et al.*, 2008 mediante polivinilpirrolidone (PVP) per rimuovere eventuali inibitori della PCR.

Per le condizioni di PCR è stato visto che, variando diverse composizioni della mix, in presenza di Albumina Serica Bovina (BSA) si ottengono reazioni di PCR più efficienti sull'estratto di DNA da vino. I protocolli di estrazione di DNA da vino sono stati variati inizialmente come segue: centrifugando un maggior volume di campione di vino (900 μL), eliminando il surnatante e risospendendo il *pellet* con soluzione fisiologica 0,9‰ a -20°C overnight. I metodi dei kit di estrazione così modificati sono stati provati su campioni di vino predisposti con gli isolati di *O. oeni* CA7/1 e BR14/97.

Dopo estrazione, quindi, si è provveduto all'amplificazione del gene *odc* sul DNA estratto utilizzando i *primer* OdF e OdR. I risultati sono stati riportati nelle figure 4.19 e 4.20 rispettivamente per i Kit Power Soil e Nucleo Spin.

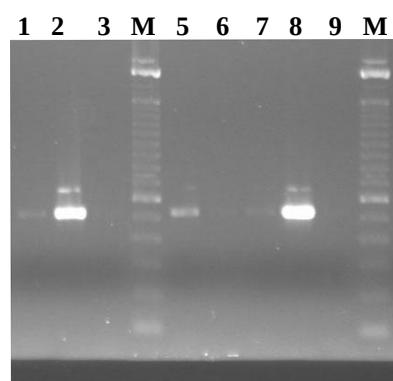


Figura 2.19. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer OdF e OdR utilizzando DNA estratto con kit Power Soil da campioni di vino inoculati con gli isolati *O. oeni* CA 7/1 e BR14/97. Linea 1: isolato CA 7/1 inoculo in vino con 10^6 CFU mL^{-1} ; Linea 2: isolato BR14/97 inoculo in vino con 10^8 CFU mL^{-1} ; Linea 3: isolato CA 7/1 inoculo in vino con 10^5 CFU mL^{-1} ; Linee 4 e 10: marker L100, Linea 5: isolato BR14/97 inoculo in vino con 10^7 CFU mL^{-1} ; Linea 6: isolato CA 7/1 inoculo in vino con 10^4 CFU mL^{-1} ; Linea 7: isolato BR14/97 inoculo in vino con 10^6 CFU mL^{-1} ; Linea 8: controllo positivo; Linea 9: controllo negativo

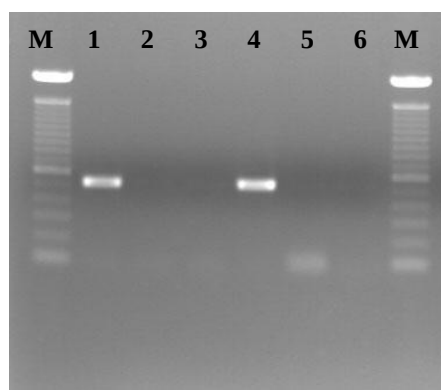


Figura 2.20. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer OdF e OdR utilizzando DNA estratto con kit Nucleo Spin su campioni di vino inoculati con gli isolati CA 7/1 e BR14/97. Linea 1: isolato CA 7/1 inoculo in vino con 10^6 CFU mL^{-1} ; Linea 2: isolato CA 7/1 inoculo in vino con 10^5 CFU mL^{-1} ; Linea 3: isolato CA 7/1 inoculo in vino con 10^4 CFU mL^{-1} ; Linea 4: isolato BR14/97 inoculo in vino con 10^8 CFU mL^{-1} ; Linea 5: isolato BR14/97 inoculo in vino con 10^7 CFU mL^{-1} ; Linea 6: isolato BR14/97 inoculo in vino con 10^6 CFU mL^{-1} . Linea 7: Marker L100.

In figura 2.19 (Kit Power Soil) è possibile osservare come l'amplicone del campione BR14/97 con un inoculo pari a 10^8 UFCmL⁻¹, presenti una maggiore intensità (Linea 2) rispetto a quello del campione CA7/1 con un inoculo a 10^6 UFCmL⁻¹ (Linea 1). Sempre nella stessa figura, invece, se si confrontano le intensità delle bande dei due campioni CA7/1 e BR14/97 a parità di inoculo iniziale, ovvero con 10^6 UFCmL⁻¹ in vino, per entrambi è stata ottenuta una intensità delle bande simile (vedi linee 1-CA7/1 e 7- BR 14/97).

La figura 2.20 mostra come dall'estrazione del DNA dei medesimi isolati, CA7/1 e BR14/97 con il kit Nucleo Spin, sia stata ottenuta l'amplificazione del gene *odc* dopo inoculo in vino rispettivamente di 10^6 UFCmL⁻¹ e 10^8 UFCmL⁻¹. Con quest'ultimo Kit sembrerebbe che lo stato di crescita della coltura di provenienza per l'inoculo influenzi la resa dell'estrazione del DNA. Per la coltura più giovane è, infatti, necessaria una popolazione microbica più bassa (10^6 CFUmL⁻¹) per ottenere un risultato analogo (Linee 2 e 4). Questi risultati sono probabilmente imputabili ai diversi principi su cui si basano i due Kit di estrazione.

Inoltre, sono state effettuate le seguenti variazioni ai protocolli di estrazione:

- trattamento dei campioni di vino in buffer di lisi cellulare in *overnight* (ON)
- dopo centrifugazione del campione di vino (900μL) il *pellet* è stato trattato con polivinilpirrolidone (PVP), lavato con soluzione fisiologica 0,9‰ e congelato a -20°C.

Gli inoculi in vino dell'isolato CA 7/1 sono stati effettuati a 10^8 UFCmL⁻¹ e 10^6 UFCmL⁻¹. Le prove con protocollo *overnight* e con PVP sono state condotte, oltre che sui due campioni di vino con *O. oeni* CA 7/1, anche su un vino in fermentazione malolattica (FML) inoculato con *O. oeni* CH 23/4. Le reazioni di PCR su DNA estratto sono state eseguite con i *primer* specie-specifici On1 e On2 senza BSA e dopo aggiunta di BSA. La quantità di DNA estratto dai

campioni è stata quantificata mediante letture con il Biofotometro (Eppendorf) a 260 nm e 280 nm e i risultati sono stati riportati nella tabella 2.7.

Tabella 2.7. Quantificazione con il Biofotometro del DNA estratto

Condizioni	Power Soil (ng μ L ⁻¹)	Nucleo Spin (ng μ L ⁻¹)
Over Night CA 7/1 (10 ⁸)	4,4	13,6
Over Night CA 7/1 (10 ⁶)	2,6	6,2
Over Night VINO in FML	2,4	10
PVP CA 7/1 (10 ⁸)	1,6	5,7
PVP CA 7/1 (10 ⁶)	0	0,9
PVP VINO in FML con 23/4	1,8	2,3
Co-coltura - 1 CA7/1	6,7	166,9
Co-coltura - 2 1/00SC	5,4	196,8
Co-coltura - 3 no <i>O.oeni</i>	6,3	214

Successivamente, sono state condotte reazioni di PCR specie-specifica senza BSA su DNA estratto con Power Soil e Nucleo Spin, ma la quantità di DNA estratto e probabilmente anche la presenza di inibitori non hanno consentito di ottenere il risultato atteso. Inoltre, per nessun campione trattato con il protocollo *overnight* è stato possibile osservare la presenza dell'amplicone, mentre è stata ottenuta una debole banda a 1025 bp per i campioni di vino inoculati con CA 7/1 a 10⁸ CFU μ L⁻¹ trattati con PVP.

Effettuando la reazione di PCR con la BSA sui medesimi campioni è stato possibile ottenere anche l'amplificazione del campione con trattamento *overnight*, ovvero del vino inoculato con CA 7/1 a 10⁸ CFU μ L⁻¹ estratto mediante kit Nucleo Spin.

Infine, allo scopo di valutare la capacità di recupero del DNA con i due Kit di estrazione testati è stata effettuata una prova in cui sono state introdotte all'interno del vino quantità note di DNA dell'isolato CA7/1 che sono state misurate mediante biofotometro dopo estrazione. Le prove di recupero del DNA da vino sono state eseguite partendo da 1500 ng μ L⁻¹, 150 ng μ L⁻¹, 80 ng μ L⁻¹ e 15 ng μ L⁻¹.

I risultati, mostrati nella tabella 4.8, hanno evidenziato che le rese di recupero con il Kit Nucleo Spin sono state migliori rispetto a quelle del Kit Power Soil (tabella 2.8)

Tabella 2.8. Quantificazione DNA al Biofotometro (Eppendorf)

Condizioni	Power Soil (ng μ L ⁻¹)	Nucleo Spin (ng μ L ⁻¹)
DNA CA 7/1 1500 ng μ L ⁻¹	2,5	12,8
DNA CA 7/1 150 ng μ L ⁻¹	0,9	19,7
DNA CA 7/1 80 ng μ L ⁻¹	2,5	8,7
DNA CA 7/1 15 ng μ L ⁻¹	2,1	13,8

Sui campioni di DNA recuperato con Power Soil e Nucleo Spin è stata successivamente effettuata la PCR con i *primer* specie-specifici. Tutti i campioni di DNA recuperato con Nucleo Spin hanno dato un prodotto di amplificazione, mentre, solo il campione contenente la quantità iniziale di 1500 ng μ L⁻¹ di DNA con Power Soil ha dato come risultato un amplicone a 1000 bp.

2.1.4. Conclusioni del I anno di attività

In seguito all'attività svolta nel primo anno è stato evidenziato quanto segue:

- Le due coppie di *primer* *CL1_{mod}*, *JV17HC* e *HDC3*, *HDC4*, riportate in letteratura per l'amplificazione del gene *hdc*, amplificano regioni diverse del genoma di *O. oeni*, per cui occorre verificare altri *primer* o sintetizzarli *ex-novo*.
- I *primer* *OdR* e *OdF* (Granchi *et al.*, 2005), essendo risultati specifici per l'amplificazione del gene *odc* codificante l'ornitina decarbossilasi in *O. oeni*, hanno permesso lo sviluppo e la validazione di un metodo rapido per l'individuazione di ceppi di *O. oeni* potenzialmente capaci di produrre in vino putrescina.
- E' stata ottenuta l'amplificazione di DNA di *O. oeni* estratto direttamente da vino con un kit disponibile in commercio dopo opportune modifiche.

2.2. Il anno di attività

Il secondo anno di attività del progetto di ricerca ha avuto la finalità di sviluppare, mediante la tecnica della Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction), un metodo rapido per quantificare, all'interno di una popolazione totale di *O. oeni* presente in un vino, i ceppi batterici potenzialmente capaci di produrre istamina e putrescina. Infatti, questa tecnica, denominata anche PCR quantitativa (Q-PCR), a differenza dei metodi tradizionali di PCR cosiddetti end-point, permette di quantificare il prodotto di amplificazione in tempo reale, ovvero mentre la reazione è in corso, mediante la misura di un segnale fluorescente che è proporzionale alla quantità della sequenza di DNA bersaglio (Orlando *et al.*, 1998). Il ciclo di PCR in cui viene rilevato un aumento significativo della fluorescenza è definito come ciclo soglia (Ct). Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie di DNA bersaglio presente inizialmente. Paragonando questo valore con quello ottenuto da una curva standard è possibile determinare con accuratezza la quantità di DNA o di cellule inizialmente presenti nel campione.

In accordo con quanto previsto dal programma l'attività sperimentale si è articolata nelle seguenti fasi operative:

2.2.1. Determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino mediante Real-Time PCR

2.2.2. Determinazione quantitativa di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina mediante Real-Time PCR

2.2.3. Sviluppo di protocolli di multiplex - PCR

2.2.1. Determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino mediante Real-Time PCR

In questa prima fase, allo scopo di quantificare la popolazione totale di *O. oeni* mediante la tecnica della Real-Time PCR è stato scelto come DNA bersaglio una porzione del gene codificante l'enzima malolattico specifica per *O.*

oeni (sequenza NCBI: X82326) secondo quanto riportato da Pinzani *et al.*, 2004. Pertanto, sono stati utilizzati i seguenti *primer*:

Forward: 5'-TCG TTC TTG CCG GCG T -3' (regione 1979-1994)

Reverse: 5'-GAA GCT CAT GTA AGT TTG ATC AGT T -3' (regione 2028-2052)

Per le reazioni di amplificazione è stato impiegato lo strumento Bio-Rad CFX96 e, come sistema di rilevamento degli ampliconi, è stato utilizzato un colorante fluorescente di recente applicazione, l'EvaGreen® che, rispetto al tradizionale SYBR Green, mostra una maggiore stabilità termica ed una minore sensibilità verso eventuali inibitori della reazione di PCR. Ciascuna reazione è stata condotta in un volume finale di 25 µL contenente 5 µL di campione, 12,5 µL di 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 0,75 µL per ciascuno dei due *primer* (300 nM ciascuno) e 6 µL di acqua ultrapura, secondo il seguente programma:

- denaturazione a 95°C per 10 minuti
- 95°C per 30 s e 60°C per 1 minuto per 45 cicli

Al termine della reazione è stata effettuata l'analisi della curva di melting per verificare che il prodotto amplificato fosse il DNA bersaglio e che fossero assenti prodotti aspecifici. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il software CFX Biorad versione 1.5. La temperatura di melting, la baseline e il ciclo soglia (Threshold Cycle = Ct) sono stati calcolati e determinati automaticamente dal software. L'attività ha previsto le fasi riportate nei successivi paragrafi.

a) Costruzione della curva standard

Lo sviluppo del protocollo di Real-Time PCR per la determinazione quantitativa di *O. oeni* ha visto come prima fase la costruzione di una curva standard mediante diluizioni seriali del DNA estratto da 4 colture di *O. oeni* appartenenti

alla collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (DiBA) e cresciute fino alla fase esponenziale in mezzo sintetico liquido (MRS, Difco integrato con 2 gL⁻¹ di Tomato Juice a pH 4,8) al fine di ottenere soluzioni a concentrazione nota da utilizzare nella reazione di amplificazione.

L'estrazione del DNA dalle colture batteriche è stata effettuata mediante il kit NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel) dopo centrifugazione di 1 mL di coltura cellulare. Il DNA di partenza è stato quantificato tramite Biofotometro Eppendorf che effettua letture a 260nm e calcolo automatico dei rapporti di A_{260/280} e A_{260/230} per valutare anche la purezza del DNA estratto. Per ciascuna estrazione la concentrazione di DNA è stata aggiustata in modo da raggiungere un valore di 50 µg mL⁻¹. Successivamente, sono state allestite 10 diluizioni seriali di un fattore 1 : 5 ottenendo così 10 soluzioni a concentrazione nota (range 50000 – 0,026 pg per tubo di reazione) da utilizzare nella reazione di amplificazione.

Delle sospensioni batteriche da cui è stato estratto il DNA è stata effettuata in triplicato anche la conta vitale su piastra in modo da poter disporre del valore in UFC mL⁻¹ corrispondente alla concentrazione di DNA (range 9,6x10⁹ – 5x10² UFC mL⁻¹). Le cinetiche di amplificazione e le relative curve di melting ottenute per campioni di DNA analizzati sono riportate, rispettivamente nelle figure 2.21 e 2.22. La curva standard ha mostrato una relazione lineare (r= 0.999) tra i cicli soglia e la concentrazione di DNA (Fig. 2.23), permettendo la quantificazione delle popolazioni batteriche con densità cellulari comprese in un *range* di 7 unità logaritmiche.

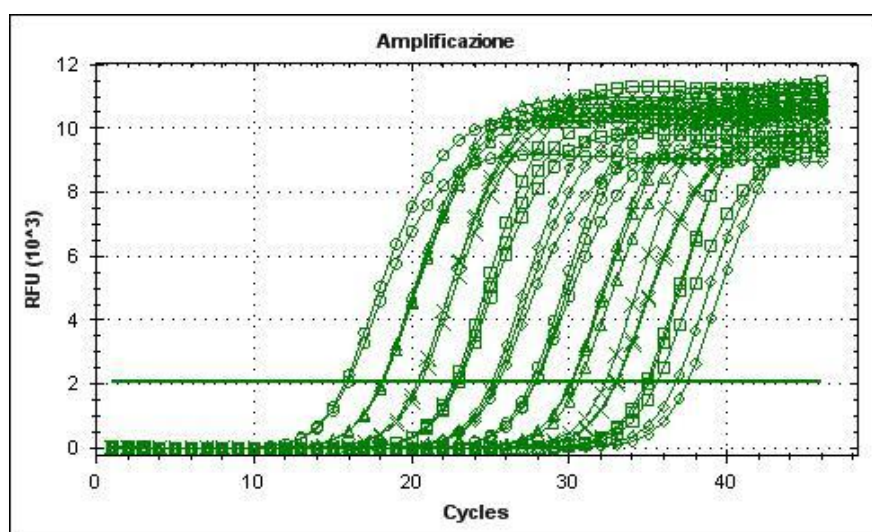


Figura 2.21. Cinetiche delle reazioni di amplificazione in Real-time PCR ottenute analizzando 10 campioni di DNA estratto da un ceppo di *O. oeni* e diluito in modo da contenere quantità comprese tra 50000 e 0,026 pg per tubo. I dati sono riportati in triplicato.

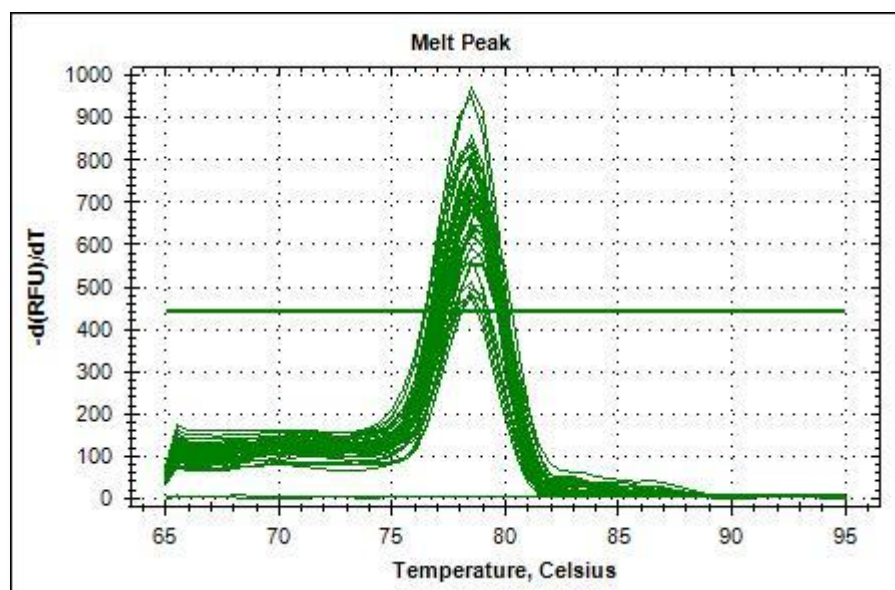


Figura 2.22. Curve di melting relative alle reazioni di amplificazione in Real-time PCR le cui cinetiche sono mostrate in figura 2.21.

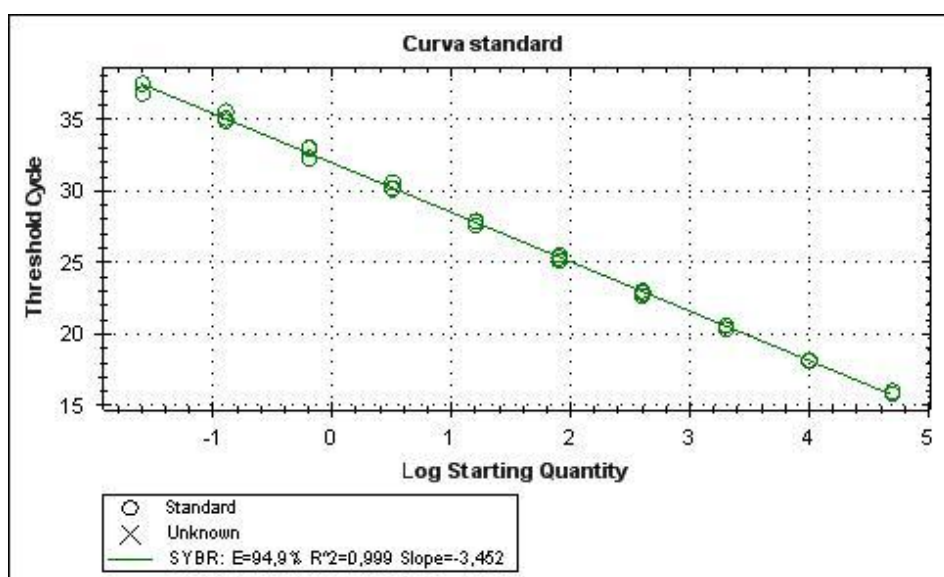


Figura 2.23. Curva standard ottenuta, dopo amplificazione mediante Real-Time PCR del gene codificante l'enzima malolattico in *O. oeni*, riportando in ordinata il valore del ciclo soglia (Threshold cycle) contro la concentrazione di DNA in ascissa (range 50000-0,026 pg per tubo corrispondente ad un range di $9,6 \times 10^9$ - 5×10^2 UFCmL⁻¹).

Dall'analisi di regressione lineare deriva anche che la retta ha un valore di *slope* (coefficiente angolare) pari a -3,452 e che l'efficienza della reazione è del 95%, valori che rientrano nel range teorico (Efficienza = 90 -100% quando $3,6 > \text{slope} > 3,1$)

b) Verifica della specificità della reazione

Successivamente, è stata valutata la specificità della reazione di PCR amplificando il DNA estratto sia da ceppi diversi di *O. oeni* che da specie diverse di batteri lattici, ma strettamente correlate ad *O. oeni* dal punto di vista filogenetico. Inoltre, considerando che in vino sono spesso presenti, contemporaneamente ai batteri lattici, elevate densità di lieviti, sono stati analizzati quattro campioni contenenti una quantità fissa di cellule di *O. oeni* e concentrazioni cellulari del ceppo *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (Lalvin) comprese tra 10^5 e 10^8 UFCmL⁻¹.

L'analisi statistica (t-test di Student, $p < 0.05$) dei risultati ottenuti in termini di cicli soglia non ha mostrato differenze significative tra i campioni analizzati, escludendo qualunque interferenza nella misura della densità cellulare batterica attribuibile alla presenza di altre specie di batteri lattici o di lieviti.

c) Determinazione quantitativa di *O. oeni* in coltura pura in mezzo sintetico

Una volta dimostrata la specificità, il protocollo di Real-Time PCR è stato applicato per la determinazione quantitativa di *O. oeni* in coltura pura. A tal fine sono stati presi in considerazione 15 colture batteriche condotte in triplo in mezzo sintetico (MRS, Difco integrato con 2 gL^{-1} di Tomato Juice a pH 4,8) a diversi tempi di incubazione in modo da avere teoricamente una variabilità di concentrazioni cellulari. Inoltre, al fine di individuare il limite delle cellule rilevabile col metodo molecolare, sono state analizzate diluizioni di un fattore pari a 10^6 di una delle colture considerate. Le cinetiche di amplificazione e le reattive curve di melting ottenute per campioni di DNA analizzati sono riportate, rispettivamente nelle figure 2.24 e 2.25. Dall'analisi delle curve di melting si evidenzia la specificità del prodotto di amplificazione dato che i picchi di fluorescenza relativi ai campioni e alle soluzioni standard di DNA sono in corrispondenza di uno stesso valore di temperatura. Nella figura 2.26 vengono mostrati i risultati della quantificazione del DNA estratto dalle colture batteriche in relazione alla curva standard. Tali risultati conseguiti con il protocollo di Real-time PCR sono stati correlati con quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra (Tabella 2.9 e Fig. 2.27).

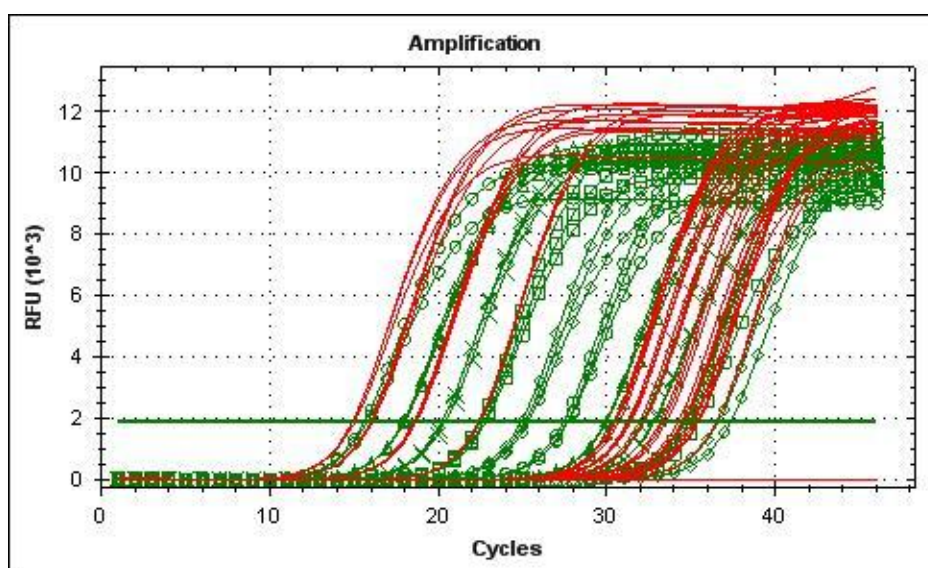


Figura 2.24. Cinetiche delle reazioni di amplificazione in Real-time PCR ottenute analizzando campioni di DNA estratto da 10 colture di *O. oeni* in mezzo sintetico (MRSTJ a pH 4,8). I dati sono riportati in triplicato (linee rosse = campioni; linee verdi= soluzioni di DNA standard)

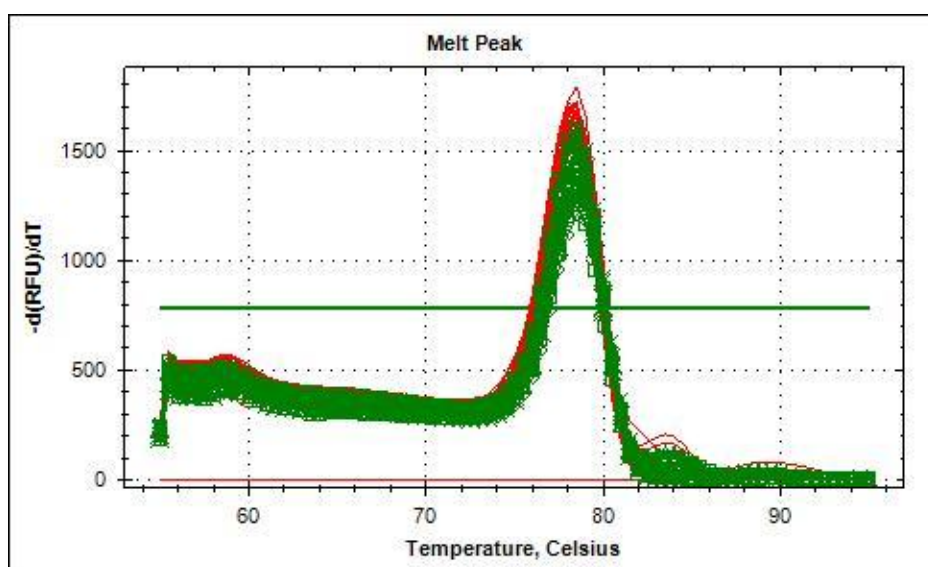


Figura 2.25. Curve di melting relative alle reazioni di amplificazione in Real-time PCR le cui cinetiche sono mostrate in figura 4. (linee rosse = campioni; linee verdi= soluzioni di DNA standard)

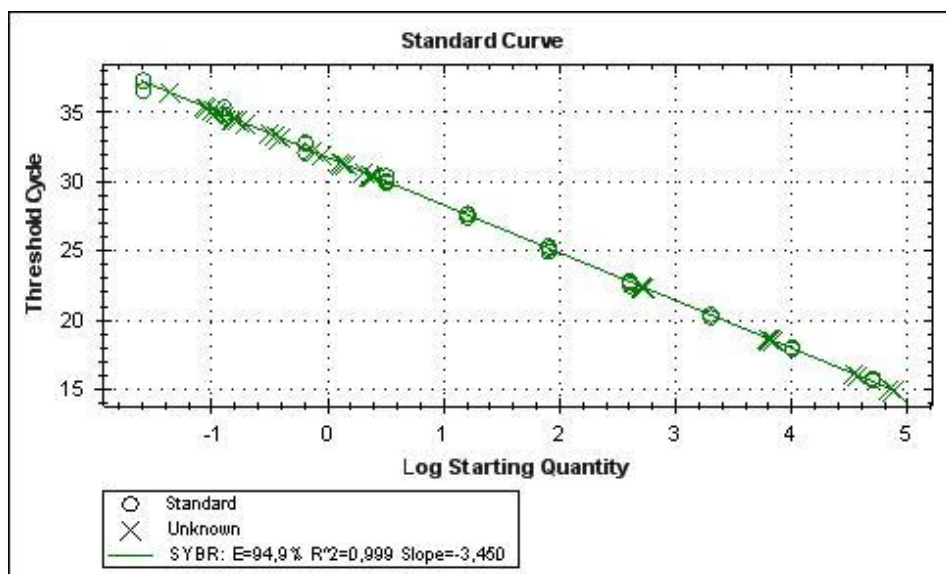


Figura 2.26. Valore dei cicli soglia (x) ottenuti mediante il protocollo di Real-Time PCR per 15 colture di *O. oeni* in mezzo sintetico in relazione alla concentrazione di DNA e alla curva standard (O).

Tabella 2.9. Determinazione quantitativa della popolazione di *O. oeni* presente in 15 colture in mezzo sintetico mediante il protocollo di Real-Time PCR e la tecnica di conta su piastra

Campione	Real-Time PCR (cellule mL ⁻¹)	Conta su piastra (UFC mL ⁻¹)
1	1,42 x 10 ⁹	2,50 x 10 ⁹
2	9,30 x 10 ⁸	1,08 x 10 ⁸
3	6,93 x 10 ⁸	6,50 x 10 ⁸
4	1,22 x 10 ⁸	7,20 x 10 ⁷
5	2,60 x 10 ⁴	1,40 x 10 ⁴
6	1,00 x 10 ⁷	5,30 x 10 ⁶
7	3,10 x 10 ³	2,60 x 10 ³
8	2,58 x 10 ⁴	4,08 x 10 ⁴
9	8,51 x 10 ³	8,01 x 10 ³
10	1,56 x 10 ⁴	1,06 x 10 ⁴
11	1,79 x 10 ³	1,29 x 10 ³
12	8,93 x 10 ³	8,43 x 10 ³
13	8,21 x 10 ²	7,71 x 10 ²
14	1,25 x 10 ⁴	3,75 x 10 ⁴
15	6,74 x 10 ³	6,62 x 10 ³

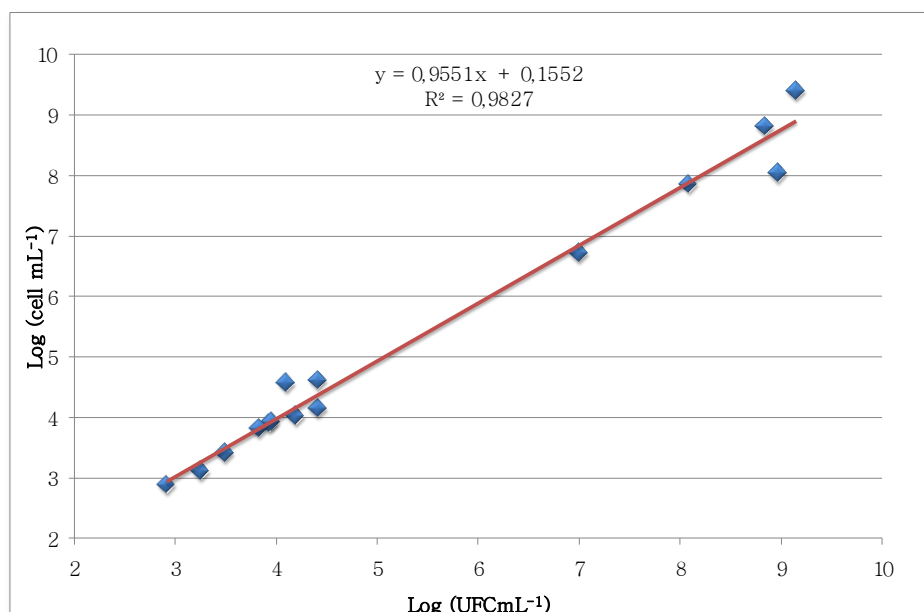


Figura 2.27. Relazione lineare tra il numero di cellule di *O.oeni* per millilitro determinato mediante Real-Time PCR e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra per 15 campioni in mezzo sintetico.

Dal confronto dei dati ottenuti con le due tecniche è emersa una ottima correlazione ($R^2=0,983$) a dimostrazione della validità del metodo rapido ai fini della quantificazione delle popolazioni di *O. oeni* in coltura pura in mezzo sintetico. Inoltre, la coltura diluita ha presentato un valore dell'ordine di 10^2 UFCmL⁻¹, che può essere considerato come il limite di rilevabilità del metodo attualmente messo a punto.

d) Determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino inoculato artificialmente

Al fine di validare il protocollo di Real-Time PCR per la determinazione quantitativa di *O. oeni* in vino è stato effettuato l'inoculo di ceppi batterici a diverse densità cellulari in campioni di vino sterilizzato per filtrazione. Il DNA è stato estratto tramite il kit Nucleo Spin® Food (Macherey-Nagel) dopo trattamento con polivinilpirrolidone

(PVP) per rimuovere gli inibitori della PCR come riportato da Jara *et al.*, 2008. Le cinetiche di amplificazione e le relative curve di melting ottenute per campioni di DNA analizzati sono riportate, rispettivamente nelle figure 2.28 e 2.29.

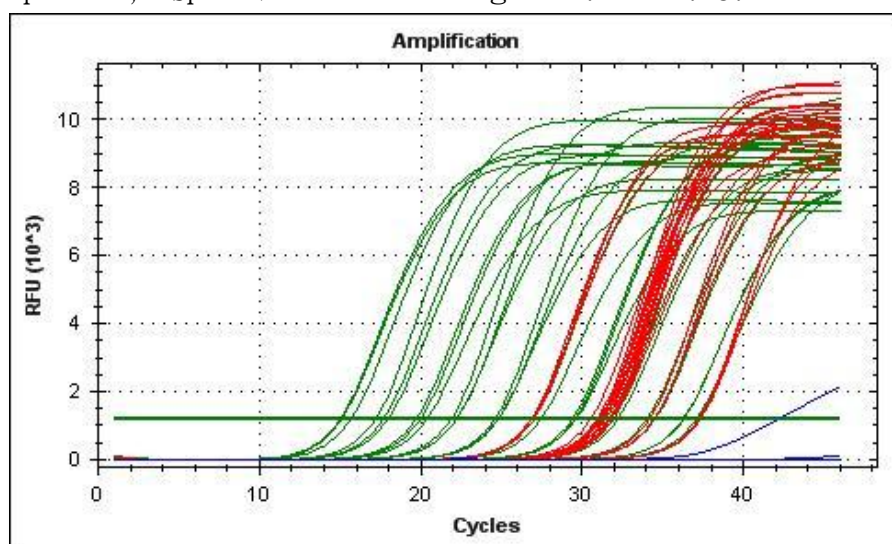


Figura 2.28. Cinetiche delle reazioni di amplificazione in Real-time PCR ottenute analizzando campioni di DNA estratto da campioni di vino. I dati sono riportati in triplicato (linee rosse = campioni; linee verdi= soluzioni di DNA standard)

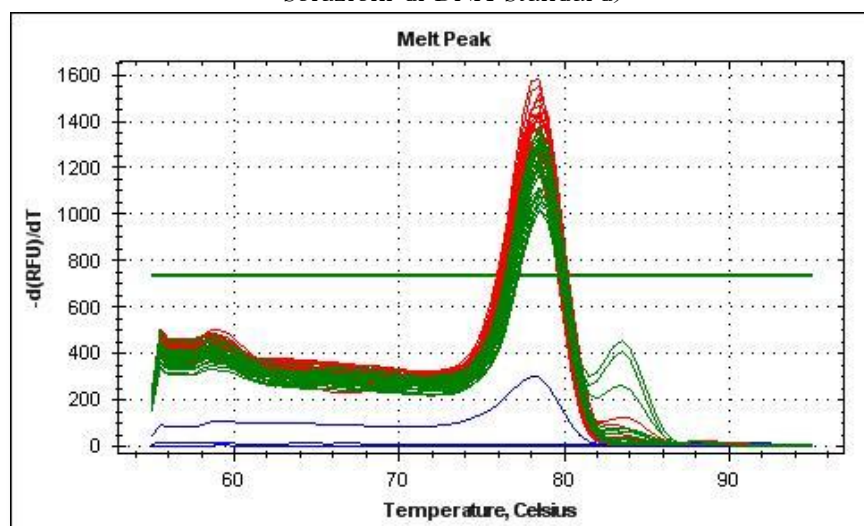


Figura 2.29. Curve di melting relative alle reazioni di amplificazione in Real-time PCR le cui cinetiche sono mostrate in figura 2.28. (linee rosse = campioni; linee verdi= soluzioni di DNA standard)

Anche in questo caso è stata confermata la specificità del prodotto di amplificazione con picchi di fluorescenza relativi ai campioni e alle soluzioni standard di DNA in corrispondenza di uno stesso valore di temperatura. Nella figura 2.30 vengono mostrati i risultati della quantificazione del DNA estratto dai campioni di vino in relazione alla curva standard.

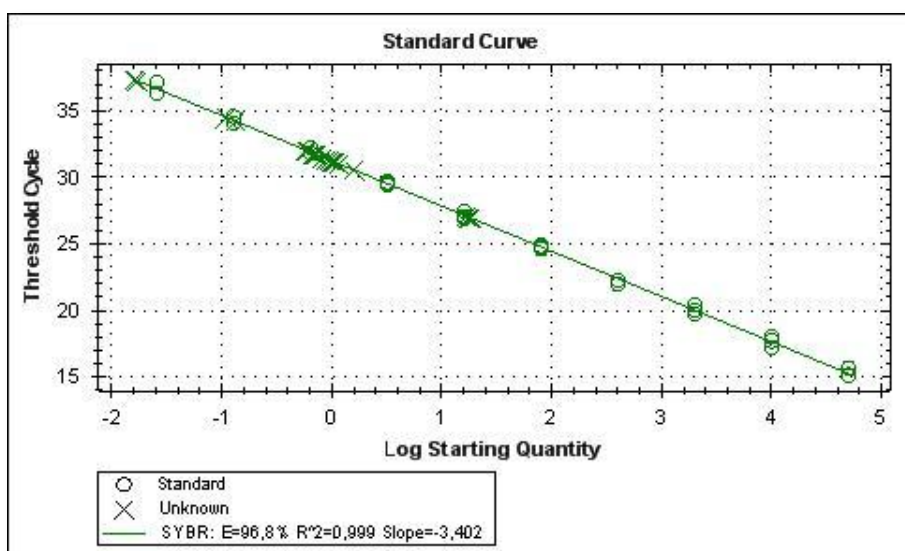


Figura 2.30. Valore dei cicli soglia (x) ottenuti mediante il protocollo di Real-Time PCR per i campioni di vino contenenti *O. oeni* in relazione alla concentrazione di DNA e alla curva standard (O).

Effettuando la correlazione tra i risultati conseguiti con il protocollo di Real-time PCR e quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra è stata ottenuta la retta mostrata in figura 2.31 che presenta un valore del coefficiente $R^2 = 0,977$, a dimostrazione che il metodo di quantificazione di una popolazione di *O. oeni* è efficace anche quando viene applicato a campioni di vino inoculati artificialmente.

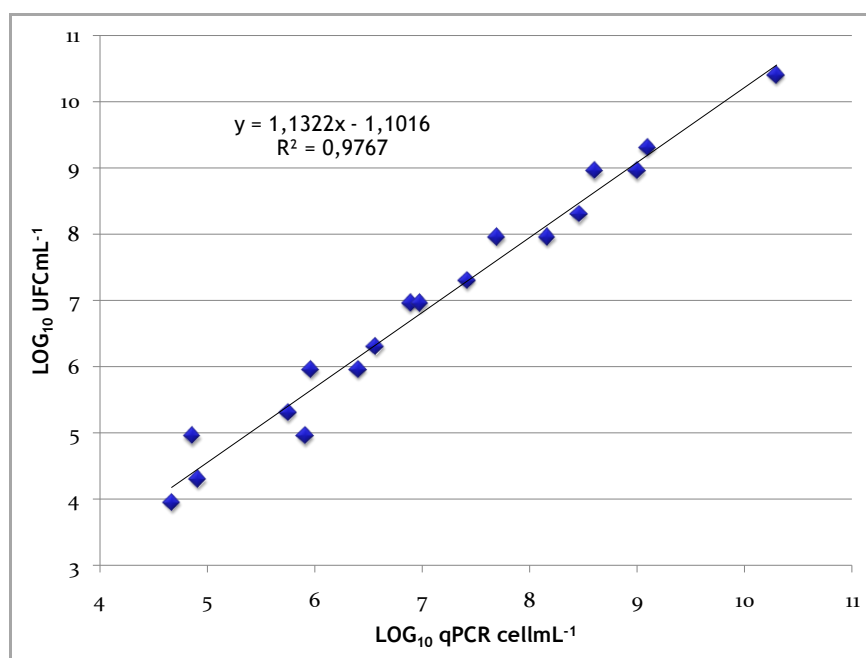


Figura 2.31. Retta di correlazione tra il numero di cellule di *O.oeni* per millilitro determinato mediante Real-Time PCR e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra dopo inoculo in vino sterile.

e) Determinazione quantitativa di *O. oeni* in campioni di vino commerciali

Successivamente, al fine di validare il protocollo di Real-Time PCR per la determinazione quantitativa di *O. oeni* direttamente in vino, sono stati analizzati alcuni campioni di vino prodotti a livello commerciale le cui caratteristiche chimico-fisiche sono mostrate nella Tabella 2.10. I risultati conseguiti con il protocollo di Real-time PCR sono stati correlati con quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra (Tabella 2.11). Dal confronto dei dati ottenuti con le due tecniche sono emerse delle differenze significative, dato che i valori delle conte in piastra sono sempre maggiori di quelli ottenuti con la Real-time PCR. Dato che tali differenze potevano dipendere da un problema di recupero del DNA legato alla membrana di silice dalla colonnina utilizzata durante l'estrazione, nelle successive

estrazioni da vino è stata introdotta una modifica del protocollo aumentando il volume del tampone di eluizione.

Tabella 2.10. *Caratteristiche dei vini commerciali analizzati mediante il protocollo di Real-time PCR per la quantificazione di O. oeni.*

Campioni	Caratteristiche dei vini			
	etanolo (% v/v)	SO ₂ totale (mg L ⁻¹)	acido malico (g L ⁻¹)	pH
1	14,35	56	1,00	3,51
2	14,60	54	0,84	3,57
3	13,55	55	0,95	3,40
4	14,95	43	0,96	3,48
5	14,05	57	1,00	3,49
6	14,15	55	1,00	3,48
7	14,00	65	0,95	3,52
8	14,05	58	0,80	3,55

Tabella 2.11. *Determinazione quantitativa della popolazione di O. oeni presente in 10 campioni di vino con diverse caratteristiche chimico-fisiche mediante Real-Time PCR e la tecnica di conta su piastra*

Campione	Real-Time PCR (cellule mL ⁻¹)	Conta su piastra (UFC mL ⁻¹)
1	1,33 x 10 ⁴	1,70 x 10 ⁶
2	1,38 x 10 ⁴	5,28 x 10 ⁵
3	2,30 x 10 ³	8,40 x 10 ⁵
4	3,21 x 10 ²	1,76 x 10 ⁶
5	2,02 x 10 ⁴	6,68 x 10 ⁵
6	2,13 x 10 ⁴	8,60 x 10 ⁵
7	3,47 x 10 ⁵	1,78 x 10 ⁷
8	2,31 x 10 ⁴	1,70 x 10 ⁶

2.2.2. Determinazione quantitativa di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina mediante Real-Time PCR

L'obiettivo è stato quindi rivolto alla quantificazione della popolazione di *O. oeni* potenzialmente in grado di produrre putrescina e istamina in vino, prendendo in esame i ceppi di *O. oeni* che, nel corso del precedente anno di attività, erano risultati produttori di tali ammine.

Mediante l' EVA Green® Real Time qPCR sono stati analizzati gli stessi geni target utilizzati precedentemente nella classica PCR end point, ovvero il gene *hdc* che codifica l'istidina decarbossilasi e il gene *odc* che codifica l'ornitina decarbossilasi, i due enzimi responsabili della sintesi delle due ammine biogene considerate. Un ceppo batterico non produttore è stato utilizzato come controllo negativo. Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 15 µL partendo da 5 µL di soluzione di DNA, in presenza di 2x SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) Real Time PCR e impiegando 3 set di *primer*: due per il gene *odc* e uno per l'*hdc*.

Allo scopo di verificare la temperatura ottimale di annealing delle tre coppie di *primer* sono state effettuate delle prove di amplificazione sul DNA stampo in gradiente termico. Il protocollo termico impostato è stato: 98°C per 2 minuti, 98°C per 3 secondi, gradiente di temperature comprese tra 53°C/65°C per 20 secondi per 39 cicli. L'analisi delle temperature di *melting* degli ampliconi è stata ottenuta in un incremento di temperature tra 65°C e 95°C effettuando una lettura completa della piastra ogni 0,5°C di aumento. In funzione dei migliori cicli soglia è stata quindi verificata la temperatura ottimale di *annealing*. Infine, per ottenere la concentrazione ottimale dei *primers* sono state eseguite delle prove di amplificazione a diverse concentrazioni, comprese tra 60 e 500 nM.

Le concentrazioni ottimali per i *primer* per l'amplificazione del **gene *odc***, riportati da Nannelli *et al.*, 2008, sono risultate le seguenti:

primer FORWARD = 450 nM. (5'-TGCACTTCCATATCCTCCAG-3')
primer REVERSE = 300 nM (5'-GAATTTCTGGAGCAAATCCA-3')
 (Dimensione prodotto di amplificazione = 127-bp)

Per l'amplificazione dello stesso gene sono stati anche disegnati i seguenti **nuovi primer**:

primer FORWARD Modc F = 5'-CCTACGGATTTATTGGTGGC-3'
primer REVERSE Modc R = 5'-GCCTTAGCTTTTCAGGGTC-3'

Per l'amplificazione del **gene *hdc***, tenuto conto dei risultati ottenuti nel primo anno, sono stati impiegati **primer diversi** riportati da Lucas *et al.*, 2008:

primer FORWARD: *hdc*Af (5'-ATGAAGCCAGGACAAGTTGG-3')
primer REVERSE: *hdc*Ar (5'-AATTGAGCCACCTGGAATTG-3')

In conclusione, per tutte e tre le coppie di *primer* è stato definito il seguente protocollo termico:

FASE	TEMPERATURA	TEMPO
Denaturazione iniziale	98°C	2 min.
Denaturazione	98°C	10 sec.
Ibridazione primers	54°C	20 sec.

} 45 cicli

In seguito all'amplificazione è stata eseguita l'analisi delle temperature di *melting* sui prodotti di PCR al fine di verificare che il *plot* di amplificazione ottenuto non presentasse prodotti aspecifici. L'incremento della temperatura è stato effettuato tra 65° e 95°C effettuando una lettura completa della piastra ogni 0,5°C di aumento.

Lo sviluppo e la validazione del protocollo per la quantificazione dei ceppi di *O. oeni* potenzialmente in grado di produrre putrescina e istamina ha previsto, le seguenti fasi:

a) Costruzione delle curve standard

Le curve standard sono state costruite mediante diluizioni seriali del DNA estratto da colture di *O. oeni* contenenti il

gene *odc* o *hdc* e quindi potenziali produttori di putrescina ed istamina, in modo da ottenere soluzioni a concentrazione nota da utilizzare nella reazione di amplificazione. La quantificazione del DNA di partenza è stata effettuata mediante biofotometro Eppendorf che effettua letture a 260nm e calcolo automatico dei rapporti di $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$. Nelle sospensioni batteriche da cui è stato estratto il DNA è stata effettuata in triplicato anche la conta vitale su piastra in modo da poter disporre anche del valore in UFCmL^{-1} corrispondente alla concentrazione di DNA.

Nelle figure 2.32 e 2.33 sono mostrate rispettivamente le cinetiche di amplificazione e le curve standard ottenute per il gene *odc* (con due coppie di *primer*) e per il gene *hdc*.

Dall'analisi di regressione lineare deriva che le rette hanno presentato i seguenti valori:

- Retta standard ottenuta con i *primer* Nannelli *et al.* 2008:
valore di *slope* (coefficiente angolare) = -3,291
coefficiente di regressione lineare $r = 0,999$
Efficienza della reazione = 101,3%
- Retta standard ottenuta con i *primer* di nuova sintesi:
valore di *slope* (coefficiente angolare) = -3,186
coefficiente di regressione lineare $r = 0,996$
Efficienza della reazione = 106,0 %
- Retta standard ottenuta con i *primer* per il gene *hdc*:
valore di *slope* (coefficiente angolare) = -3,555
coefficiente di regressione lineare $r = 0,979$
Efficienza della reazione = 91,1%

Tenendo conto che il range teorico per l'efficienza della reazione di amplificazione è = 90 -100% con valori di *slope* compresi tra 3,6 e 3,1, possiamo dedurre che tutti i risultati ottenuti per le tre curve standard sono da considerarsi idonei ai fini del loro impiego per la quantificazione delle popolazioni di *O. oeni* potenzialmente produttori di putrescina ed istamina.

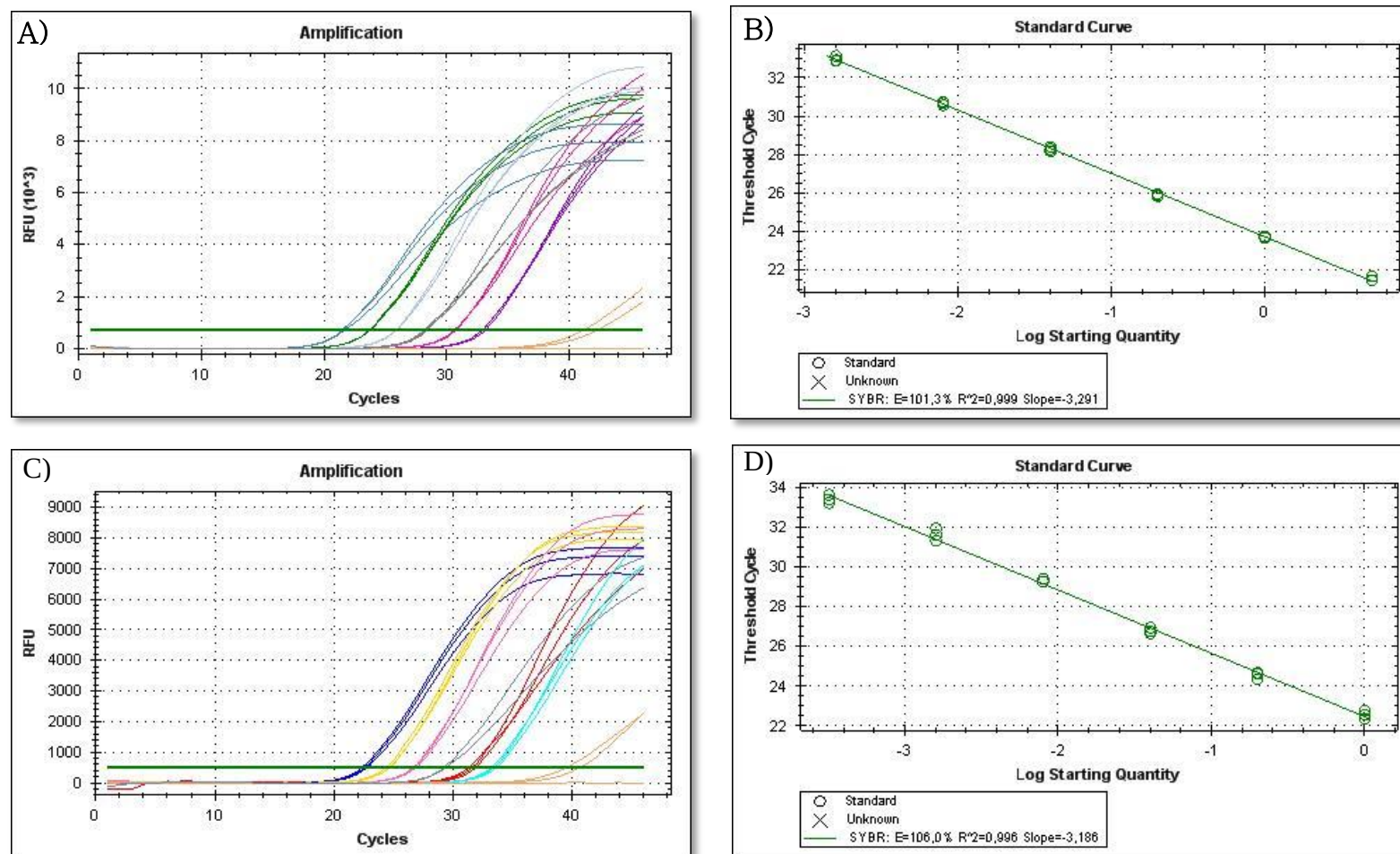
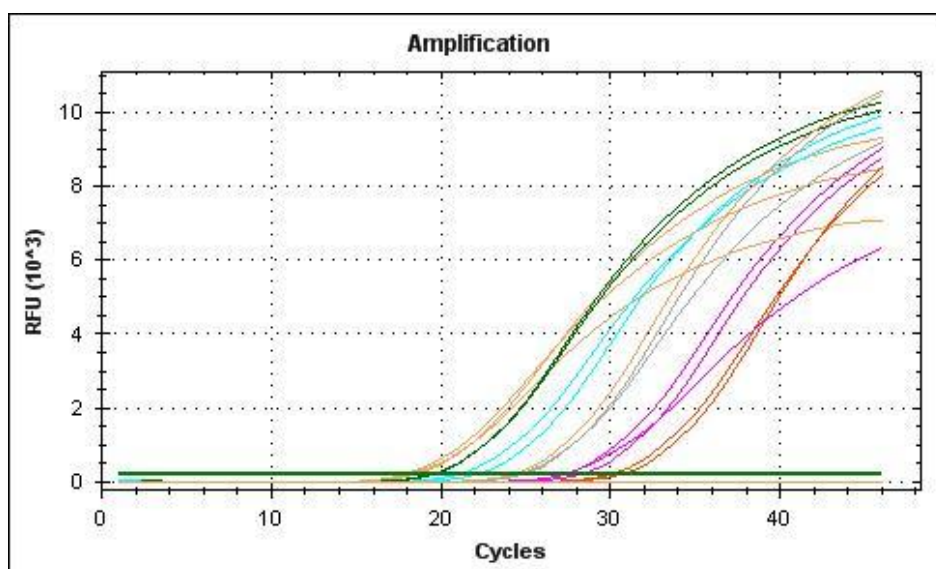


Figura 2.32 Cinetiche di amplificazione e Curve standard ottenute mediante Real-Time PCR per il gene *odc* di *O. oeni* utilizzando primer riportati da Nannelli *et al.*, 2008 (A e B) e i primer di nuova sintesi (C e D). In ordinata è riportato il valore del ciclo soglia (Threshold cycle) contro la concentrazione di DNA in ascissa

A)



B)

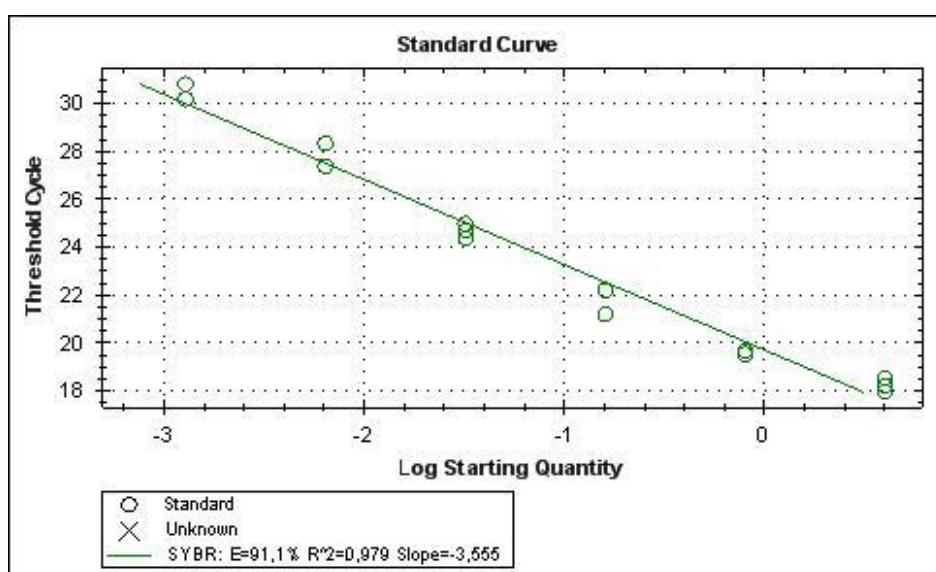


Figura 2.33 Cinetiche di amplificazione (A) e Curva standard (B) ottenuta mediante Real-Time PCR per il gene *hdc* di *O. oeni* riportando in ordinata il valore del ciclo soglia (Threshold cycle) contro la concentrazione di DNA in ascissa.

b) Determinazione quantitativa di *O. oeni* produttori di putrescina dopo inoculo in vino

Al fine di validare il protocollo di Real-Time PCR per la determinazione quantitativa in vino di ceppi di *O. oeni* potenzialmente produttori di putrescina, ceppi batterici dotati del gene *odc* sono stati inoculati a diverse densità cellulari in campioni di vino sterilizzato per filtrazione. Il DNA è stato estratto tramite il kit Nucleo Spin® Food (Macherey-Nagel) dopo trattamento con polivinilpirrolidone (PVP). Parallelamente gli stessi campioni di vino sono stati sottoposti alla semina su piastra per la determinazione delle UFCmL⁻¹. Il coefficiente di correlazione lineare tra i dati ottenuti con le due tecniche (espressi come valori logaritmici) ha presentato un elevato valore ($R^2 = 0,957$) dimostrando la validità della metodica rapida sviluppata (figura 2.34).

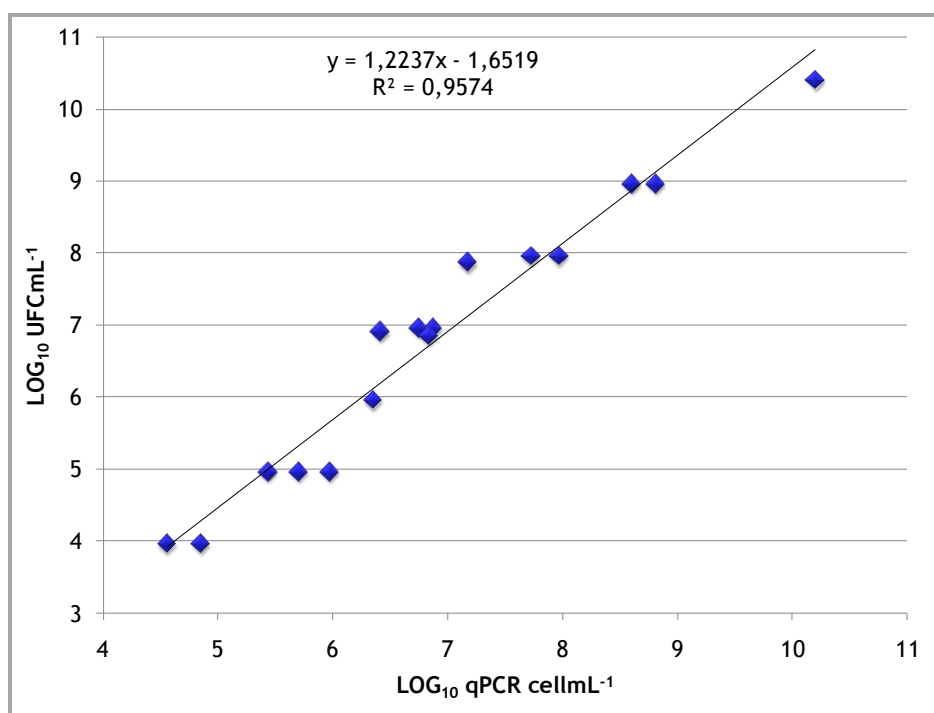


Figura 2.34. Retta di correlazione tra il numero di cellule di *O.oeni* produttori di putrescina determinato mediante Real-Time PCR e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra dopo inoculo in vino sterile.

c) Determinazione quantitativa di *O. oeni* produttori di istamina dopo inoculo in vino

Successivamente alla costruzione della curva standard con un ceppo di *O. oeni* dotato del gene *hdc* (Fig. 2.33), e quindi potenzialmente produttore di istamina, la sperimentazione ha previsto, in analogia a quanto fatto per i ceppi produttori di putrescina, l'applicazione del protocollo di Real-Time PRC in campioni di vino inoculati artificialmente con i ceppi che in precedenza erano risultati *hdc* positivi e che avevano mostrato produzione di istamina. Tuttavia, l'amplificazione, effettuata con i *primer* pubblicati da Lucas *et al.*, 2008 (vedi pag. 53), contrariamente all'attesa, non ha prodotto alcun segnale di amplificazione. Pertanto, gli stessi ceppi batterici sono stati nuovamente saggiati per la loro capacità di produrre istamina in mezzo sintetico (MRS integrato con 2gL⁻¹ Tomato Juice a pH 4,8) secondo il metodo riportato da Guerrini *et al.*, 2002. Dal momento che non è stata riscontrata istamina nel mezzo di coltura di tutti i ceppi saggiati, l'attività di ricerca è stata rivolta sia allo studio delle caratteristiche dei *primer* utilizzati per il protocollo di PCR sia allo studio della localizzazione del gene *hdc*. Infatti, nel lavoro di Lucas *et al.*, 2008 viene ipotizzato che tale gene non sia collocato sul DNA genomico ma su di un plasmide che può essere perduto dai ceppi batterici durante le sub-colture in laboratorio e che quindi potrebbe essere responsabile della instabilità della proprietà di un ceppo di produrre istamina e rendere ragione del fatto che ceppi istidina decarbossilasi positivi vengono convertiti in ceppi decarbossilasi negativi. I risultati di questa indagine sono stati ottenuti nel corso del III anno di attività (vedi pagg. 64-67)

2.2.3. Sviluppo di protocolli di multiplex PCR.

Questa fase, che prevedeva lo sviluppo di un protocollo in grado di quantificare contemporaneamente i ceppi di *O. oeni* potenzialmente produttori di istamina e putrescina e la

popolazione totale batterica presente in un vino, è stata condotta soltanto per i ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina, a causa delle problematiche emerse per i ceppi produttori di istamina. Per la messa a punto del protocollo di multiplex-PCR il gene codificante l'enzima malolattico (*mlh*) è stato utilizzato per quantificare la popolazione totale di *O. oeni*, mentre il gene codificante l'ornitina decarbossilasi per quantificare i ceppi *odc* positivi. A questo scopo, per prima cosa, è stata valutata la possibilità di sviluppare una metodica multiplex di PCR end-point utilizzando le seguenti coppie di *primer*:

1) per l'amplificazione del gene *odc*:

primer FORWARD = (5'-TGCACTTCCATATCCTCCAG-3')

primer REVERSE = (5'-GAATTTCTGGAGCAAATCCA-3')

(Dimensione prodotto di amplificazione = 127-bp)

2) per l'amplificazione del gene *mlh*:

primer FORWARD: (5'-TCGTTCTTGCCGGCGT-3')

primer REVERSE: (5'-GAAGCTCATGTAAGTTTGATCAGTT-3')

(Dimensione prodotto di amplificazione = 75-bp)

Per lo sviluppo del protocollo di multiplex PCR sono stati effettuati gli opportuni controlli come di seguito riportato:

a) Controllo della temperatura di melting (T_m) dei *primer* con il programma Optimase ProtocolWriter™ in modo da verificare che i *primer* per i DNA target presentassero valori simili di T_m o che comunque le differenze non fossero maggiori di 10°C. Infatti, una differenza di $\pm 10^\circ\text{C}$ può portare a diverse quantità di prodotti di amplificazione e spesso uno dei target non si vede.

b) Controllo della formazione o meno di dimeri tra i diversi *primer* o comunque verifica che in caso di formazione di dimeri la ΔG non fosse maggiore di - 5 Kcal/mole

Il protocollo di multiplex-PCR messo a punto, condotto in un volume finale di 25 μL , ha previsto il seguente programma di amplificazione:

Tabella 2.12 Protocollo di multiplex-PCR per l'amplificazione dei geni *odc* e *mlh* codificanti rispettivamente l'ornitina decarbossilasi e l'enzima malolattico di *O. oeni*

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	98°C	10 min.	
Denaturazione	95°C	30 sec.	} <u>10 cicli</u>
Ibridazione primers	60°C	30 sec.	
Estensione	72°C	30 sec.	
Denaturazione	95°C	30 sec.	} <u>30 cicli</u>
Ibridazione primers	54°C	30 sec.	
Estensione	72°C	30 sec.	
Completamento	72°C	10 min	
Blocco reazione	4°C	10 min	

Un esempio dei risultati conseguiti con tale protocollo saggiando ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina, e quindi dotati del gene *odc* e ceppi non produttori, è mostrato nella figura 2.34 dove sono evidenziati i due prodotti di amplificazione che presentano le dimensioni attese, ovvero 127 pb per il gene *odc* e 75 pb per il gene *mlh*.

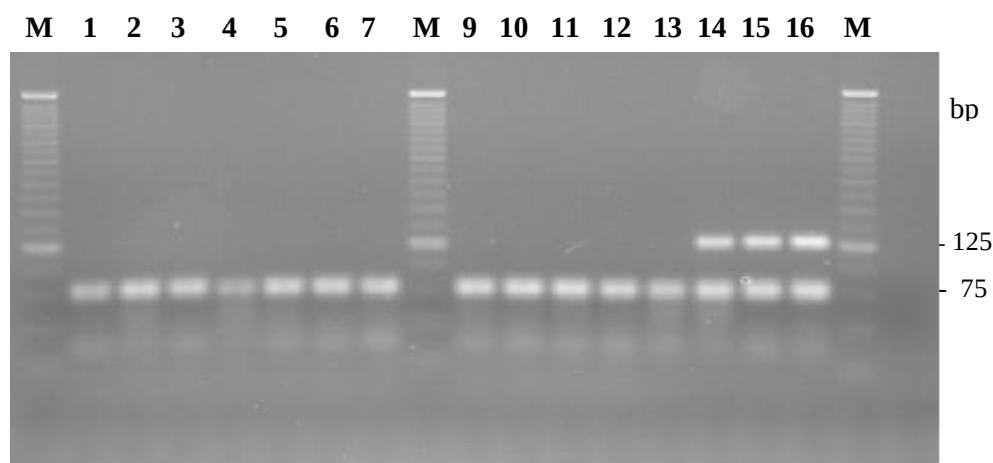


Figura 2.35. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo una reazione di multiplex-PCR con i primer *OdcF* e *OdcR* (Nannelli et al., 2008) e *Pin1F* e *Pin2R* (Pinzani et al., 2004) Linee da 1 a 16: isolati di *O. oeni*. M = marker L25.

In una seconda fase, con le stesse coppie di *primer*, è stato messo a punto un protocollo in Real-Time PCR per quantificare contemporaneamente la popolazione totale di *O. oeni* e la popolazione dei ceppi batterici potenzialmente produttori di putrescina. A tal fine una coltura di un ceppo di *O. oeni* produttore di putrescina ed una coltura di un ceppo non produttore cresciute in mezzo sintetico fino alla fase stazionaria sono state utilizzate per ottenere una coltura batterica mista composta dal 70% del ceppo produttore e dal 30% del ceppo non produttore. La coltura mista così allestita è stata sottoposta a diluizioni decimali in modo da ottenere in totale 6 campioni da analizzare. La determinazione quantitativa della popolazione produttrice di putrescina rispetto alla popolazione batterica totale conseguita mediante il protocollo di Real-Time PCR (figura 2.36) è risultata prossima a quella attesa

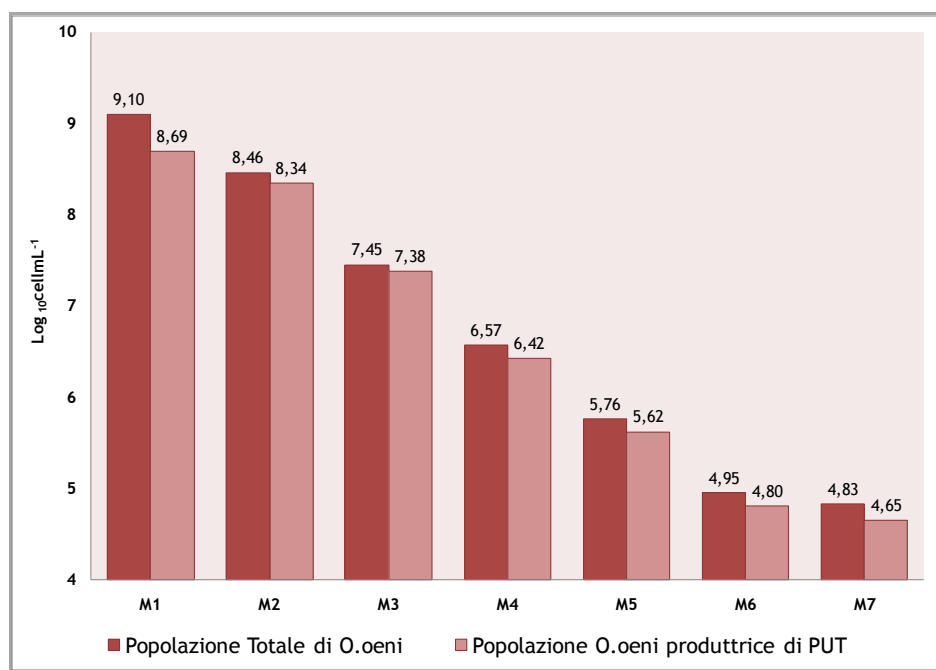


Figura 2.36. Quantificazione della popolazione di *O. oeni* produttrice di putrescina rispetto alla popolazione batterica totale conseguita mediante il protocollo di multiplex Real-Time PCR.

2.2.4. Conclusioni del II anno di attività

L'attività svolta nel secondo anno ha portato allo sviluppo di metodi diagnostici rapidi basati su protocolli di PCR-end-point e di Real-Time PCR (Q-PCR) rispettivamente per la rilevazione e la quantificazione di popolazioni di *O. oeni* sia in mezzo sintetico che in vino artificialmente inoculato con ceppi batterici a densità note.

In particolare, sono stati sviluppati e validati:

1. un protocollo per quantificare la popolazione totale di *O. oeni*;
2. un protocollo di multiplex-PCR (end-point) per mettere in evidenza con una sola reazione ceppi di *O. oeni* produttori di putrescina (*odc*⁺) e ceppi non produttori,
3. un protocollo di multiplex Real-Time PCR per quantificare una popolazione di ceppi di *O. oeni* dotati del gene *odc*, e quindi potenzialmente capaci di produrre putrescina, rispetto ad una popolazione batterica totale.

Tuttavia, il primo ed il terzo protocollo applicati a DNA estratto direttamente da campioni di vino commerciali ha dato risultati inferiori rispetto a quelli ottenuti con la metodica classica di conta su piastra, evidenziando possibili problemi di recupero del DNA totale. Il primo protocollo è stato modificato aumentando il volume di eluizione del DNA ed applicato nel terzo anno di attività per il monitoraggio di fermentazioni malolattiche su scala pilota (vedi pag. 122-129). Per quanto riguarda la messa a punto di analoghi protocolli di PCR quantitativa per i ceppi di *O. oeni* dotati del gene *hdc* e produttori di istamina, è stato possibile soltanto la costruzione della curva standard dato che, in seguito, i ceppi batterici oggetto di studio nel I anno non sono risultati più capaci di produrre istamina e non hanno più presentato il prodotto di amplificazione corrispondente al gene *hdc*. Per questo motivo, nel III anno di attività, è stato introdotto un ulteriore studio rivolto sia all'analisi delle caratteristiche dei *primer* per evidenziarne l'efficienza, sia alla valutazione della possibile localizzazione del gene *hdc* su di un plasmide.

2.3. III anno di attività

Il terzo anno di attività ha avuto lo scopo di valutare l'influenza di alcuni fattori intrinseci sulla produzione di ammine biogene (AB) in vino da parte di *Oenococcus oeni*, includendo fattori sia di tipo nutrizionale (zuccheri, acido malico, aminoacidi precursori delle AB) sia di interesse fisiologico per la cellula (pH ed etanolo).

Tuttavia, prima di procedere a questa indagine, l'attenzione è stata focalizzata sul problema emerso durante il secondo anno di attività di ricerca, ossia sul fatto che, nessun ceppo di *O. oeni*, diversamente da quanto riscontrato in precedenza, risultava capace di produrre istamina e che in base alle reazioni di PCR, condotte con i diversi *primer* disponibili in letteratura per amplificare il gene *hdc*, non veniva ottenuto alcun prodotto di amplificazione. Questi risultati potevano indurre a formulare le seguenti ipotesi:

- i protocolli di PCR sono poco efficienti per cui il gene è presente ma non viene amplificato;
- il gene è presente ma le condizioni colturali impiegate non favoriscono né la sua espressione né la produzione di istamina da parte di *O. oeni* per cui i ceppi "apparentemente" risultano non produttori;
- il gene *hdc* è localizzato su di un plasmide per cui è necessaria una estrazione del DNA plasmidico per evidenziarlo ed, inoltre, i ceppi batterici possono perdere il plasmide passando da produttori di istamina a non produttori;
- il gene *hdc* non è presente e quindi non viene prodotta istamina.

Per cercare di fornire una spiegazione a quanto osservato sono state eseguite sia analisi dei *primer* impiegati nei protocolli di PCR sia diverse prove sperimentali.

Complessivamente, l'attività condotta nel terzo anno del progetto si è articolata nelle seguenti fasi operative:

- 2.3.1. Studio dei *primer* utilizzati per l'amplificazione del gene *hdc*.
 - 2.3.2. Studio delle condizioni colturali per il mantenimento del gene *hdc* in *O. oeni*
 - 2.3.3. Valutazione della localizzazione del gene *hdc* su plasmide
 - 2.3.4. Valutazione delle fecce come sistema-modello per studiare la produzione di AB in vino da parte di *O. oeni*
 - 2.3.5. Messa a punto di un protocollo di multiplex-PCR per individuare isolati di *O. oeni* produttori di istamina
 - 2.3.6. Influenza di fattori nutrizionali sulla produzione di AB in vino da parte di *O. oeni*.
 - 2.3.7. Studio dell'influenza del pH e dell'etanolo sulla produzione di AB da parte di *O. oeni* mediante un disegno sperimentale composito centrale
 - 2.3.8. Equazioni polinomiali per descrivere la velocità di crescita di *O. oeni* in funzione del pH e dell'etanolo
 - 2.3.9. Equazioni polinomiali per descrivere il rilascio di AB da parte di *O. oeni* al variare di pH e etanolo.
 - 2.3.10. Analisi delle componenti principali sui risultati ottenuti con il disegno sperimentale.
-

2.3.1 Studio dei *primer* utilizzati per l'amplificazione del gene *hdc*.

Per definire se la mancata amplificazione fosse dovuta all'assenza del gene *hdc* o diversamente ad altri problemi legati ai protocolli di reazione, per prima cosa sono state studiate le caratteristiche dei vari *primer* utilizzati durante la ricerca. Le sequenze dei *primer* prese in esame sono le seguenti:

hdcAf (5'-ATGAAGCCAGGACAAGTTGG-3')	} Lucas <i>et al.</i> , 2008
hdcAr (5'-AATTGAGCCACCTGGAATTG-3')	
PHDC1 (5'- CCGTGCGGAAACAAAGAAT 3')	} Costantini <i>et al.</i> , 2006
PHDC2 (5'- CCAAACACCAGCATCTTCA 3')	

HDC3 : 5' GATGGTATTGTTTCKTATGA 3' } Coton *et al.*, 2005
 HDC4: 5' CAAACACCAGCATCTTC 3' }

In base allo studio effettuato, è stato evidenziato che almeno uno dei due *primer* di ciascuna coppia presa in esame si lega all'interno di strutture secondarie del gene *hdc* (Figure 2.37 e 2.38), fatto che può determinare una diminuzione della resa della reazione o addirittura un'assenza di amplificazione. Le strutture secondarie, infatti, competono per l'annealing del *primer* con lo stampo sulla sequenza di DNA bersaglio, diminuendo drasticamente la concentrazione effettiva di *primer* disponibile per la reazione di amplificazione.

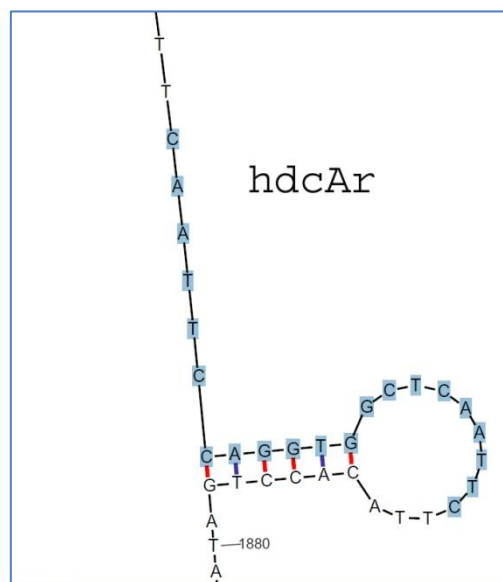


Figura 2.37. Localizzazione del primer reverse (*hdcAr*) di Lucas *et al.*, 2008 su una struttura secondaria a "forcina" del gene *hdc*.

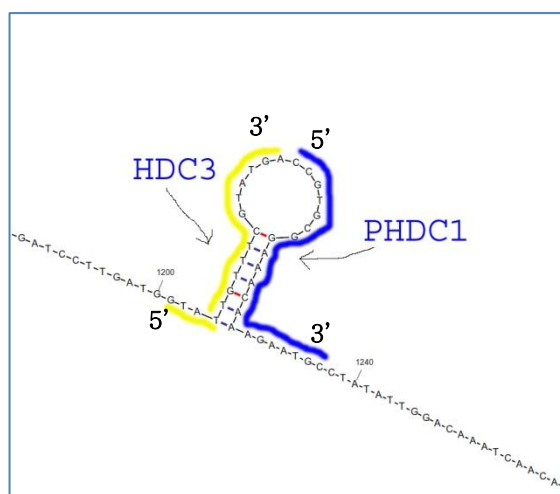


Figura 2.38. Localizzazione di due primer riportati in letteratura per l'amplificazione del gene *hdc* su strutture secondarie del gene stesso.

In definitiva, dato che l'assenza del prodotto di amplificazione del gene dell'istidina decarbossilasi (*hdc*) poteva dipendere dalle caratteristiche dei *primer*, in base alle sequenze depositate in GenBank, sono stati disegnati i seguenti nuovi *primer*:

FORWARD **HDC241**: 5' GCATCAAGTTTCTCTGG 3'
 REVERSE **HDC4**: 5' CAAACACCAGCATCTTC 3'

Tuttavia, anche con l'impiego dei nuovi *primer* i ceppi di *O. oeni* oggetto della ricerca non hanno fornito alcun prodotto di amplificazione, confermandosi *hdc*-negativi.

2.3.2. Studio delle condizioni colturali per il mantenimento del gene *hdc* in *O. oeni*

Parallelamente allo studio delle caratteristiche dei *primer* sono state saggiate delle condizioni colturali che, in letteratura, sono ritenute favorire la produzione di istamina. In particolare, l'usuale mezzo sintetico utilizzato per la crescita di *O. oeni* (MRS integrato con 2 gL⁻¹ di Tomato Juice a pH 4,8) è stato modificato in modo tale da

determinare delle condizioni più stressanti per le cellule batteriche che sembrano indurre la formazione di AB. Le modifiche apportate al mezzo sono state le seguenti:

- sostituzione dei 30 gL⁻¹ di glucosio previsti nella composizione standard dell'MRS con 1 gL⁻¹ di glucosio e 1 gL⁻¹ di fruttosio, integrazione di 5 gL⁻¹ di acido malico, 100 mgL⁻¹ di istidina ed etanolo al 5% (v/v);
- eliminazione dell'estratto di carne dal mezzo e sostituzione con estratto di lievito, integrazione di etanolo al 5% (v/v);

La capacità di produrre o meno istamina nelle diverse condizioni è stata determinata sia attraverso analisi HPLC dei fermentati sia mediante analisi molecolari per stimare la presenza del gene dell'istidina decarbossilasi. Dai risultati è emerso che i mezzi saggiati non hanno consentito di individuare una condizione colturale che permettesse ai ceppi di mantenere la capacità di produrre istamina.

2.3.3. Valutazione della localizzazione del gene *hdc* su plasmide

Al fine di valutare se il gene *hdc* fosse localizzato su plasmide, come ipotizzato da Lucas *et al.*, 2008, sono stati isolati nuovi ceppi di *O. oeni* da vini contenenti istamina mediante semina su MRS a pH 4,8 integrato con Tomato Juice 2g/L in modo da disporre di cellule batteriche che non fossero state sottoposte a diverse sub-colture, condizione che è ritenuta favorire l'eventuale perdita di un plasmide. Le colonie ottenute sono state quindi utilizzate per la produzione della biomassa che è stata sottoposta a diversi protocolli per l'estrazione del DNA plasmidico, tutti basati sulla lisi cellulare con detergenti in ambiente alcalino. Uno dei protocolli impiegati è riportato nella figura 2.39. Dopo l'estrazione il DNA plasmidico è stato purificato mediante KIT Nucleo-spin® Extract II, sottoposto a corsa elettroforetica e ad amplificazione mediante i nuovi *primer* HCD241-HCD4 per evidenziare l'eventuale presenza del

gene *hdc*. Dalle prove finora condotte non sono emersi risultati positivi, ma è opportuno procedere con il sequenziamento del DNA plasmidico.

1. Trasferire 2 ml della coltura batterica in una provetta "eppendorf" da 2 ml.
2. Tappare e centrifugare a **14.000 RPM** per **30 sec**.
3. Eliminare il sopranatante (aspirare con una pipetta pasteur collegata ad una pompa a vuoto).
4. Risospendere **BENE** (pipettando) il pellet batterico in **100 µl di soluzione I** a temperatura ambiente.

SHOCK OSMOTICO (soluzione ipotonica)	Soluzione I: 50 mM glucosio 25 mM Tris Cl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0)
--	--
6. Aggiungere **200 µl di soluzione II** a temperatura ambiente.

LISI DEI BATTERI (lisi alcalina)	Soluzione II 0.2N NaOH 1% SDS
--	--
7. Mescolare invertendo **delicatamente** i tubi per almeno 5 volte. La soluzione diventa viscosa.
8. Lasciar riposare sul banco per 5 min. a temperatura ambiente.
9. Aggiungere **150 µl di soluzione III fredda**.

PRECIPITAZIONE DIFFERENZIALE (salting-out)	Soluzione III 5M potassio acetato 60ml acido acetico glaciale 11.5ml H ₂ O 28.5ml
--	---
10. Agitare gentilmente il tubo per almeno 5 volte (in modo da mescolare la soluzione ed il lisato batterico).
11. Incubare in ghiaccio per 5 min.
12. Centrifugare a **14.000 RPM** per **5 min**.
13. Prelevare il sopranatante (**400 µl**) con la P1000 e trasferirlo in una provetta eppendorf pulita.
14. Aggiungere **2 µl di RNasi A** (10 mg/ml) e **4 µl di Proteinasi K** (10 mg/ml).
15. Incubare 30 min a 50°C.
16. Aggiungere **400 µl di soluz. organica** (fenolo/cloroformio/alcool isoamilico 25:24:1) (usare i guanti).
17. Tappare (bene!) ed agitare energicamente per 5-10 sec.
18. Centrifugare a **14.000 RPM** per **2 min**. La soluzione si separerà in una fase "organica" (in basso) contenente i lipidi ed alcune proteine, ed in una fase "acquosa" (in alto) contenente gli acidi nucleici.
19. Prelevare 300 µl della fase acquosa (superiore) con la P1000, facendo attenzione a **non rimescolare** le fasi e l'**interfaccia** (dove si trovano le proteine), e trasferirli in una provetta eppendorf pulita.
20. Aggiungere 2 volumi di **etanolo** (assoluto) a temperatura ambiente.
21. Incubare per 2 min a temperatura ambiente.
22. Centrifugare a **14.000 RPM** per **5 min**. Si formerà un deposito biancastro (pellet) sul fondo del tubo.
23. Rimuovere il sopranatante, porre il tubo in posizione invertita su un foglio da banco, rimuovere tutte le gocce.
24. Far asciugare il pellet per 10 min all'aria, o per 30 sec in speedvac.
25. Risospendere il pellet di acidi nucleici in **50 µl di TE** (10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 8.0) o in H₂O.
26. Conservare il DNA a -20°C.
27. Analizzare i plasmidi per digestione con enzimi di restrizione o per sequenziamento del DNA.

Figura 2.39. Protocollo per l'estrazione del DNA plasmidico

2.3.4. Valutazione delle fecce come sistema-modello per studiare la produzione di AB in vino da parte di *O. oeni*

L'impossibilità di disporre di ceppi appartenenti alla specie *O. oeni* con una capacità stabile a produrre istamina ha imposto dei cambiamenti all'approccio sperimentale proposto in fase di attuazione del progetto, senza però modificare gli obiettivi della ricerca. A tale scopo è stata valutata la possibilità di utilizzare un vino commerciale, che aveva appena terminato la fermentazione malolattica e che presentava un contenuto di istamina di circa $2,5 \text{ mgL}^{-1}$, come fonte di ceppi microbici appartenenti alla specie *O. oeni* produttori di AB senza utilizzare l'approccio microbiologico classico che prevede in successione: la semina in piastra del vino, l'isolamento delle colonie, la purificazione, l'identificazione, il mantenimento in collezione ed infine l'impiego sperimentale. Pertanto, sapendo che i vini che permangono per tempi lunghi sulle fecce sono maggiormente soggetti a incrementi nel contenuto di AB (Pérez-Serradilla e Luque de Castro, 2008), dal fondo della botte contenente il vino che presentava istamina sono stati prelevati alcuni litri di vino feccioso con lo scopo di utilizzare questo materiale per valutare l'influenza dei vari fattori intrinseci sulla formazione di AB in vino.

Prima di allestire la sperimentazione è stata condotta.

- a. un'indagine per valutare le caratteristiche microbiologiche del materiale feccioso.*
- b. un'indagine per valutare se le fecce potevano rappresentare un sistema-modello per lo studio della produzione di AB*

Indagine per valutare le caratteristiche microbiologiche del materiale feccioso.

Per quantificare le popolazioni microbiche dominanti è stata eseguita una conta vitale su mezzi selettivi per lieviti (WL agar Oxoid con propionato di sodio e streptomycin), batteri acetici (LF agar con pimaricina e penicillina: glucosio,

10 gL⁻¹; estratto di lievito, 5 gL⁻¹; peptone, 5 gL⁻¹; Tomato Juice 2 gL⁻¹; pH 5,0) e batteri lattici (MRS agar Oxoid pH4,8 integrato con 2 gL⁻¹ di Tomato Juice Difco e pimarcina). I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2.13.

Tabella 2.13: Popolazioni microbiche presenti nel vino feccioso.

Popolazione	UFCmL ⁻¹
Batteri lattici	(2,02 + /- 0,14) x 10 ⁶
Lieviti	<10
Batteri acetici	(2,00 + /- 0,09) x 10 ⁴

Un numero significativo di isolati (circa 80) provenienti dal mezzo MRS sono stati identificati utilizzando metodiche molecolari direttamente su colonia. In particolare, è stata utilizzata una PCR specie-specifica che prevede l'amplificazione del gene malolattico con i *primer* On1 e On2 (Zapparoli *et al.*, 1998). La miscela di reazione (volume finale 25 µL) era così composta: Polymed PCR buffer (Polymed, Firenze); dNTP, 1mM; primer ON1, 2,5 •M; primer ON2, 2,5 •M; BSA, 10mM; MgCl₂, 25mM; Taq DNA polimerasi, 5U. Il protocollo termico era il seguente: 3 min a 94 °C; 30 cicli: 94 °C per 45 sec, 60 °C per 2 minuti, 72 °C per 2 minuti; 72 °C per 10 minuti; 15 °C). L'amplicone atteso era di 1025 bp. Tutti gli isolati saggiati sono risultati appartenere alla specie *Oenococcus oeni* (figura 2.40)

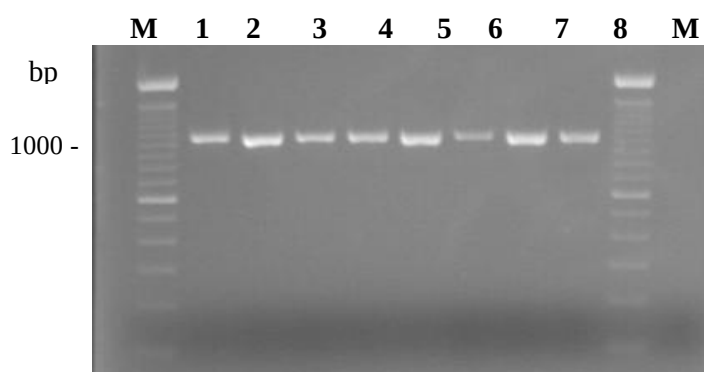


Figura 2.40. Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo reazione di PCR con i primer On1 e On2. Linee da 1 a 8: isolati di *O. oeni*. M = -marker L100

L'identificazione di alcuni isolati è stata anche confermata mediante sequenziamento del gene 16S rDNA.

L'amplificazione del gene sottoposto al sequenziamento è stata ottenuta con i *primer*

FD1 (5' CAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')

RD1 (5' GCTTAAGGAGGTGATCCAGCC 3')

descritti da Weisburg *et al.* (1991). La miscela di reazione PCR (volume finale 25 µL) era così composta: Polymed PCR buffer (Polymed, Firenze); dNTP, 1mM; primer FD1, 1 µM; primer FD2, 1 µM; BSA, 10mM; MgCl₂, 2 mM; *Taq* DNA polimerasi, 1U (Polymed, Firenze). Il protocollo termico era il seguente: 4 minuti a 94 °C; 35 cicli: 94 °C per 30 sec, 65°C per 2 minuti, 72 °C per 1 minuti; 72 °C per 10 minuti. Infine, le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate nel database di "GenBank" ed hanno mostrato tutte un'omologia di sequenza con la specie *O. oeni* di circa il 99%. Pertanto, alla luce dei risultati ottenuti, è possibile ritenere *O. oeni* la popolazione lattica dominante nel vino feccioso studiato. Per verificare l'esistenza o meno di una popolazione lattica secondaria presente nel vino feccioso, sono state eseguite colture di arricchimento di questo materiale utilizzando il mezzo riportato in tabella 2.14 integrato singolarmente con 17 fonti di carbonio diverse. Secondo quanto riportato in letteratura (Dicks *et al.*, 1995), tutti i ceppi appartenenti alla specie *O. oeni* riescono ad utilizzare glucosio e fruttosio, mentre solo alcuni trealosio, arabinosio, xilosio, cellobiosio, galattosio, mannosio e melibiosio. Pertanto, le 17 fonti di carbonio sono state scelte in modo tale che alcune di queste fossero incapaci di supportare la crescita di *O. oeni*, ma fermentescibili da altri batteri lattici del vino. Le fonti di C integrate singolarmente al mezzo sono state le seguenti:

arabinosio, cellobiosio, galattosio, saccarosio, glicerolo, lattosio, maltosio, mannosio, melizitosio, melibiosio, raffiniosio, ramnosio, ribosio, trealosio, xilosio, glucosio, fruttosio.

Tabella 2.14: *Composizione del mezzo impiegato per le colture di arricchimento integrato singolarmente con ciascuna delle 17 fonti di carbonio scelte.*

Componenti	Concentrazione
Peptone	10 gL ⁻¹
Estratto di lievito	4,0 gL ⁻¹
Fosfato di potassio	2,0 gL ⁻¹
Acetato di sodio	10,0 gL ⁻¹
Magnesio solfato 7 H ₂ O	0,20 gL ⁻¹
Manganese solfato 4H ₂ O	0,05 gL ⁻¹
Tween 80	1,0 mL ⁻¹
Porpora di bromocresolo	0,16 gL ⁻¹

I vari mezzi sono stati integrati anche con pimaricina per inibire l'eventuale sviluppo dei lieviti e le colture sono state allestite in anaerobiosi per sfavorire la crescita dei batteri acetici. L'indicatore acido/base "porpora di bromo cresolo" integrato ai mezzi è stato aggiunto per individuare le condizioni colturali che portavano a un'acidificazione della coltura e quindi alla fermentazione della fonte di carbonio presente. La prova è stata allestita in provette da 10 mL inoculando 1 mL di vino feccioso in 9 mL di mezzo per ciascuna delle 18 condizioni colturali; 1 mL di vino feccioso è stato inoculato anche in 9 mL di mezzo senza la fonte di carbonio (bianco). Le colture sono state incubate per 15 giorni a 30°C. Tale sperimentazione è stata eseguita due volte a distanza di due mesi mantenendo il materiale feccioso a 20°C nell'intervallo di tempo tra le due prove. Le colture che mostravano viraggio e intorbidimento sono state centrifugate a 4000xg, il pellet è stato sottoposto ad analisi ARDRA (amplificazione del 16S secondo quanto sopra riportato e digestione dell'amplicone con gli enzimi *RsaI* e *BfaI*), mentre il surnatante ad analisi HPLC per quantificare l'eventuale contenuto di AB (Guerrini et al., 2002).

Dopo incubazione, le provette che hanno mostrato viraggio e intorbidamento sono state quelle contenenti i

seguenti zuccheri fermentescibili:

arabinosio, cellobiosio, saccarosio, maltosio, melibiosio, raffinosio, ribosio, trealosio, glucosio.

L'analisi al microscopio ha mostrato la presenza in tutte le provette di cocci in catenelle, mentre in quelle contenenti maltosio e ribosio, oltre ai cocci in catenelle, sono state evidenziate anche cellule a bastoncino. Il test di Gram ha consentito di stabilire che i cocci erano Gram positivi, come atteso per *O. oeni*, mentre i bastoncini erano Gram negativi, lasciando supporre uno sviluppo di batteri acetici nelle provette contenenti **maltosio** e **ribosio**. Per l'identificazione a livello di specie dei microrganismi presenti nelle provette che avevano mostrato il viraggio è stata eseguita da ciascuna di esse l'estrazione del DNA. L'analisi ARDRA sul DNA estratto ha mostrato i risultati riportati in figura 2.41 dove è possibile osservare i profili attesi per *O. oeni* in tutti i pozzetti. I pozzetti 4 e 7 (DNA da coltura con maltosio e ribosio rispettivamente) hanno invece mostrato 2 profili sovrapposti, uno dei quali attribuibile a *O. oeni*. I profili diversi da quelli di *O. oeni* riscontrati nei pozzetti 4 e 7 erano tra loro identici e sono stati confrontati con quelli teorici ricavati da GenBank per i batteri acetici.

I risultati ottenuti hanno individuato in *Acetobacter pasteurianus* il batterio cresciuto in presenza di maltosio e ribosio (Tabella 2.15). Il sequenziamento del 16S rDNA ha confermato tale risultato.

Tabella 2.15: Dimensione teorica degli ampliconi del 16SrDNA e dei frammenti ottenuti con gli enzimi di restrizione *RsaI* o *BfaI*.

	16Sr DNA	<i>RsaI</i> (Teorico)	<i>BfaI</i> (Teorico)
<i>Oenococcus oeni</i>	1458	(445)+ 406+ (356) + 150 + 146+ 35 + 34	519+ 494+ 231 + 13 3+ 87+ 42+ 39 + 25
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1572	563 + 482 + 259+ 10 8+ 46	451+ 280+ 262 + 17 9+ 108+ 90 + 88

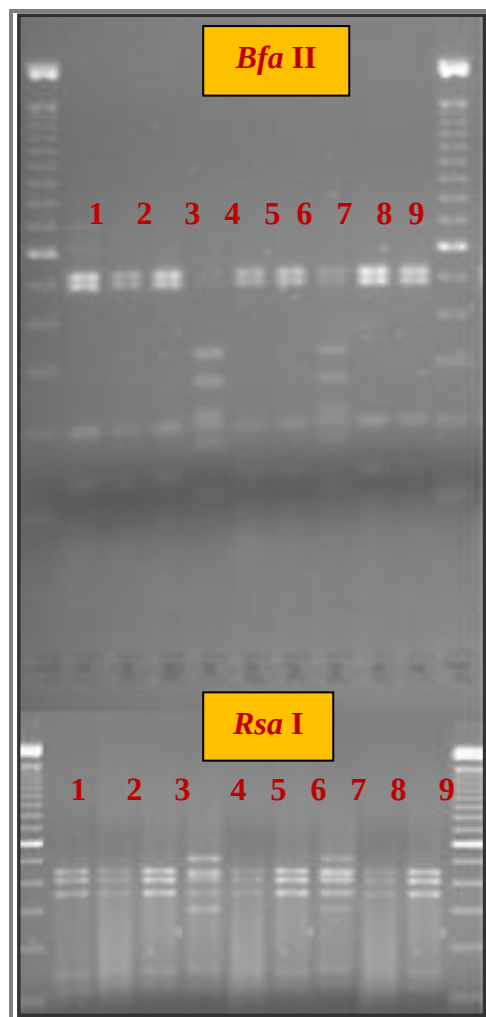


Figura 2.41. Profili di restrizione del 16SrDNA ottenuti dopo digestione con gli enzimi *BfaII* e *RsaI*. I pozzetti 4 e 7 (DNA da coltura con maltosio e ribosio rispettivamente) mostrano 2 profili sovrapposti attribuibili ad *O. oeni* e *A. pasteurianus*, mentre gli altri pozzetti mostrano profili di *O. oeni*. (Ladder 100)

L'analisi HPLC per quantificare le AB prodotte nelle varie colture di arricchimento che hanno mostrato sviluppo microbico sono mostrate in tabella 2.16. Dalla tabella è possibile osservare, rispetto al bianco, un rilascio significativo di putrescina e istamina in tutte le condizioni

che hanno mostrato *O. oeni* come popolazione dominante. Le colture di arricchimento contenenti maltosio o ribosio come fonte di carbonio che mostravano anche la presenza di *A. pastorianus*, oltre a quella di *O. oeni*, avevano incrementi significativi (ANOVA, $p < 0,05$) a carico rispettivamente della putrescina e della istamina.

Per valutare l'eventuale capacità dei batteri acetici di produrre AB, isolati provenienti direttamente dal vino feccioso oppure dalla coltura di arricchimento contenente maltosio sono stati inoculati, dopo identificazione mediante ARDRA, su terreno LF liquido integrato con 100 mgL^{-1} di ciascuno degli aminoacidi precursori delle principali AB (istidina, tirosina e ornitina). Le colture sono state poste in beute in agitazione continua a 30°C . Nessuno degli isolati saggiati a fine crescita ha mostrato produzione di AB. Quanto osservato è in accordo con Landete *et al.* (2007), ma in contrasto con Chang *et al.* (2009) che hanno riportato l'esistenza di batteri acetici produttori di AB.

Dai risultati ottenuti risulta evidente che la formazione di putrescina e istamina osservata nelle colture di arricchimento sia da attribuirsi unicamente alla popolazione di *O. oeni*. Per ulteriore verifica, circa 100 isolati, ottenuti direttamente dalle fecce sono stati analizzati mediante PCR specie-specifica (*primer* On1 e On2) come descritto in precedenza. Tutti gli isolati saggiati hanno mostrato amplificazione dimostrando di appartenere alla specie *O. oeni*. Contemporaneamente, è stata saggiata tra questi isolati la diffusione del gene *hdc* mediante la reazione PCR in precedenza descritta (*primer*: HDC241-HDC4).

Dai risultati ottenuti è possibile osservare come circa il 15% degli isolati saggiati abbia dimostrato di possedere il gene *hdc*. La stessa indagine è stata eseguita prendendo in esame il gene *odc* utilizzando la reazione di multiplex-PCR messa a punto in precedenza (vedi pagg. 59-60). Dai risultati ottenuti la frequenza di diffusione del gene *odc* è risultata intorno al 25%.

Tabella 2.16: *Contenuto di AB nelle colture di arricchimento; i dati riportati in tabella sono la media (+/- deviazione standard) delle due prove eseguite a distanza di due mesi (nr: non rilevabile).*

Fonte di carbonio	Feniletilamina (mgL ⁻¹)	Putrescina (mgL ⁻¹)	Cadaverina (mgL ⁻¹)	Istamina (mgL ⁻¹)	Tiramina (mgL ⁻¹)	Spermidina (mgL ⁻¹)	Spermina (mgL ⁻¹)
Bianco	Nr	11,00+/-0,02	2,31+/-0,40	14,00+/-0,14	1,92+/-0,41	0,91+/-0,20	0,27+/-0,1
Arabinosio	0,17+/-0,04	24,77+/-2,21	10,62+/-0,25	21,75+/-0,25	1,69+/-0,65	0,84+/-0,26	0,28+/-0,12
Cellobiosio	0,12+/-0,03	90,99+/-1,00	8,16+/-0,05	17,34+/-1,25	2,24+/-0,63	0,92+/-0,01	0,34+/-0,11
Saccarosio	0,18+/-0,09	91,71+/-0,67	3,53+/-1,26	25,47+/-3,57	3,84+/-2,43	0,96+/-0,05	0,39+/-0,06
Melibiosio	0,05+/-0,03	98,79+/-0,74	4,94+/-0,30	21,89+/-2,07	2,18+/-0,78	0,90+/-0,04	0,30+/-0,02
Raffinosio	0,12+/-0,01	90,51+/-2,04	5,09+/-0,52	23,98+/-1,98	3,14+/-0,47	0,96+/-0,03	0,35+/-0,05
Ribosio	0,09+/-0,12	13,97+/-3,97	1,54+/-0,41	24,12+/-0,04	2,26+/-0,87	0,95+/-0,00	0,32+/-0,17
Trealosio	0,23+/-0,32	92,26+/-20,55	3,85+/-4,40	23,85+/-1,06	2,64+/-1,56	0,93+/-0,07	0,35+/-0,02
Maltosio	0,13+/-	85,48+/-1,57	1,63+/-0,57	16,61+/-1,18	1,23+/-0,97	1,03+/-0,08	0,23+/-0,04
Glucosio	Nr	116,37+/-15,86	7,85+/-0,47	27,71+/-1,25	1,90+/-0,48	0,95+/-0,04	0,31+/-0,6

Da quanto fin qui esposto, è possibile concludere che:

- il vino feccioso contiene popolazioni vitali e coltivabili di batteri lattici e di batteri acetici;
- la popolazione lattica è costituita da batteri appartenenti alla specie *O. oeni*;
- nessuna evidenza sperimentale sembra indicare la presenza di popolazioni lattiche appartenenti a specie diverse da *O. oeni*;
- i batteri acetici presenti nel vino feccioso non sono risultati in grado di produrre AB;
- circa il 15% della popolazione di *O. oeni* presente nel vino feccioso è risultata in grado di produrre istamina, mentre circa il 25% di produrre putrescina.

Il vino feccioso, quindi, può essere considerato come una fonte diretta di ceppi appartenenti alla specie *O. oeni* perfettamente adattati all'ambiente vinario e capaci di produrre AB, senza bisogno di passare attraverso colture in mezzo sintetico che provocano, in questa specie microbica, la perdita della capacità di produrre istamina.

Indagine per valutare se le fecce potevano rappresentare un sistema-modello per lo studio della produzione di AB

Per valutare la possibilità di utilizzare le fecce come modello per studiare il rilascio di AB nei vini, 10 mL di vino feccioso (1/3 di fecce, 2/3 di vino) sono stati risospesi in 90 mL di un mezzo sintetico con una composizione chimica che simula quella del vino (MRS modificato pH 3,6: estratto di carne, 8 gL⁻¹; peptone, 10 gL⁻¹; estratto di lievito, 8 gL⁻¹; di acido malico 2 gL⁻¹, glucosio 1 gL⁻¹; fruttosio 1 gL⁻¹; ammonio citrato 2 gL⁻¹, Tween 80 1 ml/L; acetato di sodio 5 gL⁻¹; K₂HPO₄ 2 gL⁻¹; solfato di magnesio 0,2 gL⁻¹; solfato di manganese 0,05 gL⁻¹; Tomato Juice Difco 2 gL⁻¹; etanolo 10 % v/v). Al mezzo sono stati aggiunti streptomina e

pimaricina per impedire lo sviluppo di batteri acetici e lieviti rispettivamente e l'efficacia di essi è stata verificata mediante semina sui mezzi di coltura WL e LF precedentemente descritti. Le colture sono state allestite in anaerobiosi sostituendo l'aria con azoto e sono state incubate a 20°C. Ogni settimana, per quasi tre mesi, sono state eseguite conte vitali su piastra e contemporaneamente analisi HPLC per verificare la capacità della popolazione di *O. oeni* presente nelle fecce a rilasciare AB. Gli andamenti delle popolazioni microbiche e le cinetiche di rilascio delle AB rispetto al tempo sono riportate in figura 2.42. Analisi molecolari (PCR specie-specifica con i *primer* On1 e On 2) sono state eseguite direttamente sulle colonie cresciute su MRS durante ciascun campionamento e i risultati ottenuti hanno mostrato la sola presenza di *O. oeni* durante tutto il periodo della sperimentazione. Tutte le conte microbiologiche e le analisi chimiche per quantificare le AB sono state eseguite in doppio e mostrano come la popolazione batterica sia vitale, capace di crescere e di produrre putrescina, tiramina e istamina in concentrazioni significative da un punto di vista enologico. Tiramina e istamina sono state rilasciate prevalentemente durante la fase di crescita esponenziale della popolazione lattica, mentre la putrescina è stata prodotta soprattutto in fase stazionaria e durante la fase di morte. Da quanto riportato da Mangani *et al.* (2005) la produzione di putrescina da ornitina da parte di *O. oeni* avviene prima dell'esaurimento dell'acido malico, mentre quella da arginina dopo l'esaurimento di questo nutriente. Considerando che nella presente sperimentazione il 67% della putrescina è stata prodotta dopo la fermentazione malolattica, è possibile affermare che le fecce contengono una popolazione numericamente significativa di ceppi appartenenti alla specie *O. oeni* capaci di produrre putrescina da arginina. Il fatto di disporre di una popolazione microbica capace di produrre oltre a putrescina e istamina anche tiramina ha

fornito la possibilità di estendere lo studio anche sulla formazione di questa AB che per la sua tossicità risulta di particolare interesse.

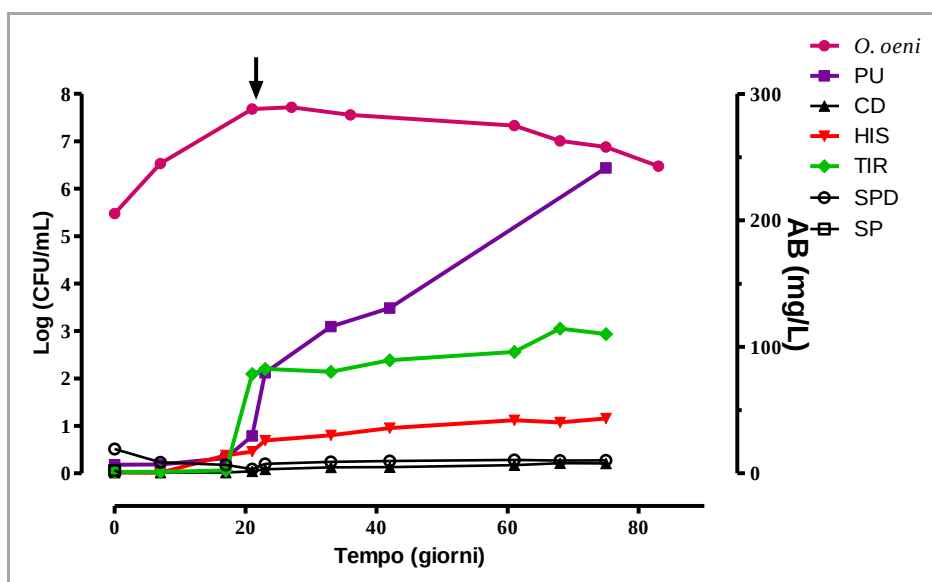


Figura 2.42: Dinamica della popolazione di *O. oeni* e del rilascio di AB quando il materiale feccioso era inoculato su un mezzo sintetico che simula la composizione del vino; la freccia indica la fine della degradazione dell'acido malico.

Per comprendere il ruolo svolto dalle fecce sulla sopravvivenza di *O. oeni* e sulla sua capacità di rilasciare AB, la parte chiara del vino è stata suddivisa in sei aliquote da 100 mL ciascuna. La prova è stata così allestita:

- 2 aliquote integrate con 100 mgL^{-1} di istidina, 100 mgL^{-1} di tirosina
- 2 aliquote integrate con 100 mgL^{-1} di istidina, 100 mgL^{-1} di tirosina, 1 gL^{-1} di acido malico
- 2 aliquote senza integrazioni

A ciascuna coltura sono stati aggiunti gli antibiotici streptomicina e pimarcina per impedire lo sviluppo di batteri acetici e lieviti rispettivamente e l'efficacia di essi è stata verificata mediante semina sui mezzi di coltura WL e

LF precedentemente descritti. Le colture sono state allestite in anaerobiosi sostituendo l'aria con l'azoto e sono state incubate a 20°C. Ogni settimana per circa un mese sono state eseguite conte vitali su MRS pH4,8 integrato con Tomato Juice incubato in anaerobiosi a 30°C per monitorare la cinetica della popolazione lattica e analisi HPLC per quantificare il rilascio di AB. Tutte le analisi sono state eseguite in doppio. I risultati ottenuti sono mostrati nella figura 2.43 ed evidenziano come la popolazione lattica vitale, privata del materiale feccioso, presenti una rapida fase di declino, nonostante l'integrazione di acido malico e degli aminoacidi precursori delle principali AB. Infine, per verificare la presenza di *O. oeni*, dalle piastre di MRS ottenute al tempo zero e dopo dieci giorni sono state prelevate circa 50 colonie e su di esse è stata eseguita la PCR specie-specifica sopra descritta. Tutti gli isolati saggiati si sono dimostrati appartenere a questa specie. Come prevedibile dagli andamenti microbiologici, la quantità di AB non è incrementata significativamente durante tutta la durata della prova, confermando il ruolo centrale di *O. oeni* nel rilascio di tali sostanze.

Dai dati fin qui ottenuti si evidenzia che:

- per studiare come alcuni parametri intrinseci influenzino il rilascio di AB da parte delle popolazioni di *O. oeni* naturalmente presenti in vino, è necessario utilizzare la parte fecciosa di questa matrice.
- Il motivo per il quale *O. oeni* muoia in assenza del materiale feccioso è probabilmente da attribuire al fatto che questo materiale molto eterogeneo potrebbe contenere alcuni nutrienti, fattori di crescita o di sopravvivenza necessari a questa specie per sopravvivere nelle difficili condizioni vinarie.
- Dai risultati ottenuti è comunque evidente che tali sostanze non sono né l'acido malico, né gli aminoacidi precursori delle AB.

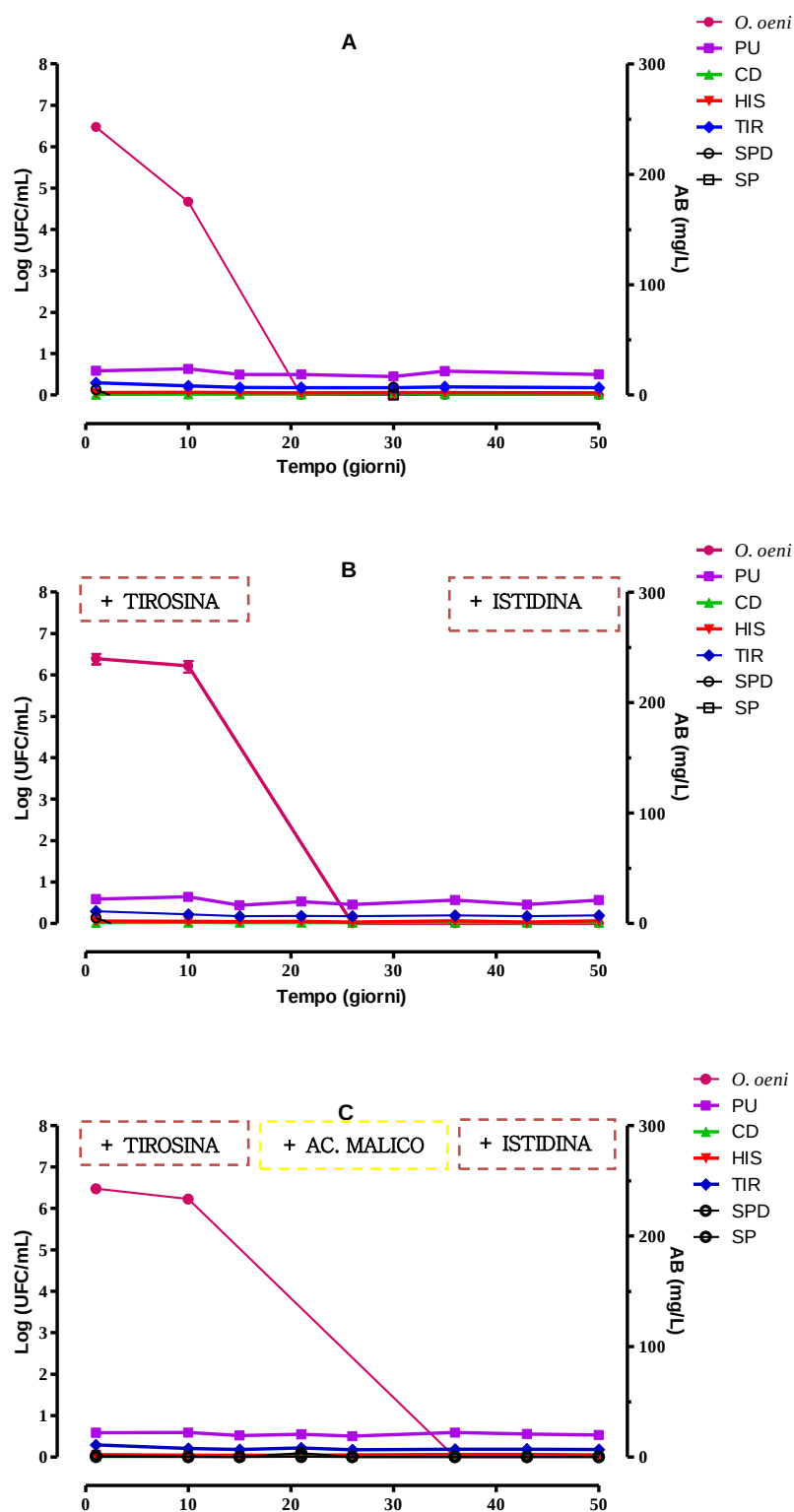


Figura 2.43. Andamento delle popolazioni di *O. oeni* e del rilascio di AB rispetto al tempo nelle tre condizioni: senza aggiunta di integrazioni (A), con aggiunta di aminoacidi precursori di istamina e tiramina (B), con aggiunta di acido malico e precursori di istamina e tiramina (C).

2.3.6. Messa a punto di un protocollo di multiplex-PCR per individuare isolati di *O. oeni* produttori di istamina.

Per rendere più rapido il successivo lavoro sperimentale, è stata messa a punto un protocollo di multiplex PCR end-point, eseguibile direttamente da colonia, per verificare contemporaneamente l'appartenenza degli isolati alla specie *O. oeni* e l'eventuale possesso da parte di questi del gene istidina decarbossilasi (*hdc*). Per la metodica sono stati utilizzati le seguenti coppie di *primer*:

1) per l'amplificazione del gene *hdc*:

HDC241: 5' GCATCAAGTTTCTCTGG 3'

HDC4: 5' CAAACACCAGCATCTTC 3'

(Dimensione prodotto di amplificazione = 390-bp)

2) per l'amplificazione del gene *mlh*:

ON1: 5' TAATGTGGTTCTTGAGGAGAAAAT 3'

ON2: 5' ATCATCGTCAAACAAGAGGCC 3'

(Dimensione prodotto di amplificazione = 1025-bp)

Il protocollo messo a punto prevede il seguente programma termico:

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	
Denaturazione iniziale	98°C	10 min.	
Denaturazione	95°C	30 sec.	} 10 cicli
Ibridazione <i>primer</i>	60°C	30 sec.	
Estensione	72°C	2 min.	
Denaturazione	95°C	30 sec.	} 30 cicli
Ibridazione <i>primer</i>	52°C	30 sec.	
Estensione	72°C	2 min.	
Completamento	72°C	10 min	
Blocco reazione	4°C	10 min	

In tutte le prove di seguito riportate, la popolazione lattica è stata saggiata con questa tecnica. Un esempio dei risultati conseguiti mediante l'applicazione di questo

protocollo durante la sperimentazione è mostrato nella figura 2.44 dove sono evidenti i due prodotti amplificati delle dimensioni attese, ovvero 390 pb per il gene *hdc* e 1025 per il gene *mlh*.

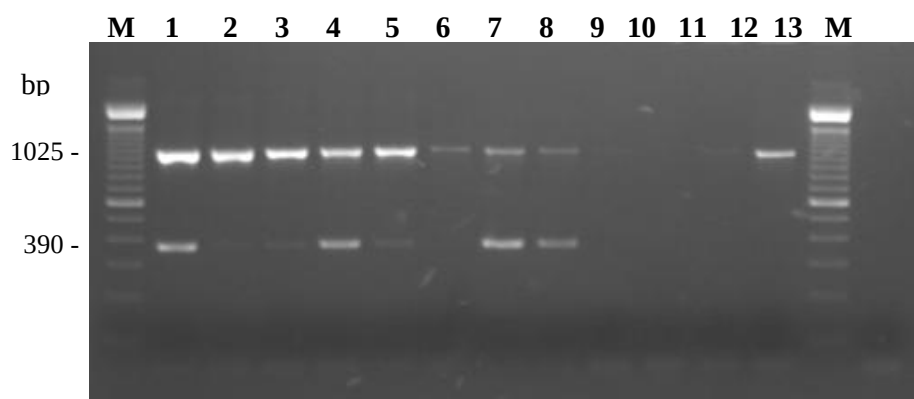


Figura 2.44: . Analisi mediante elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti dopo una reazione di multiplex-PCR con i primer HDC241 e HDC4 (Bronzini com. personale) e On1 e On2 (Zapparoli et al., 1998) Linee da 1 a 8: *O. oeni*. M = marker L100.

2.3.6. Influenza di fattori nutrizionali sulla produzione di AB in vino da parte di *O. oeni*.

Per valutare in che modo la disponibilità di aminoacidi e di acido malico possa influenzare il rilascio di AB da parte di *O. oeni*, il vino feccioso (1/3 di fecce, 2/3 vino) è stato suddiviso in dodici aliquote da 100 mL ciascuna e la prova è stata così allestita:

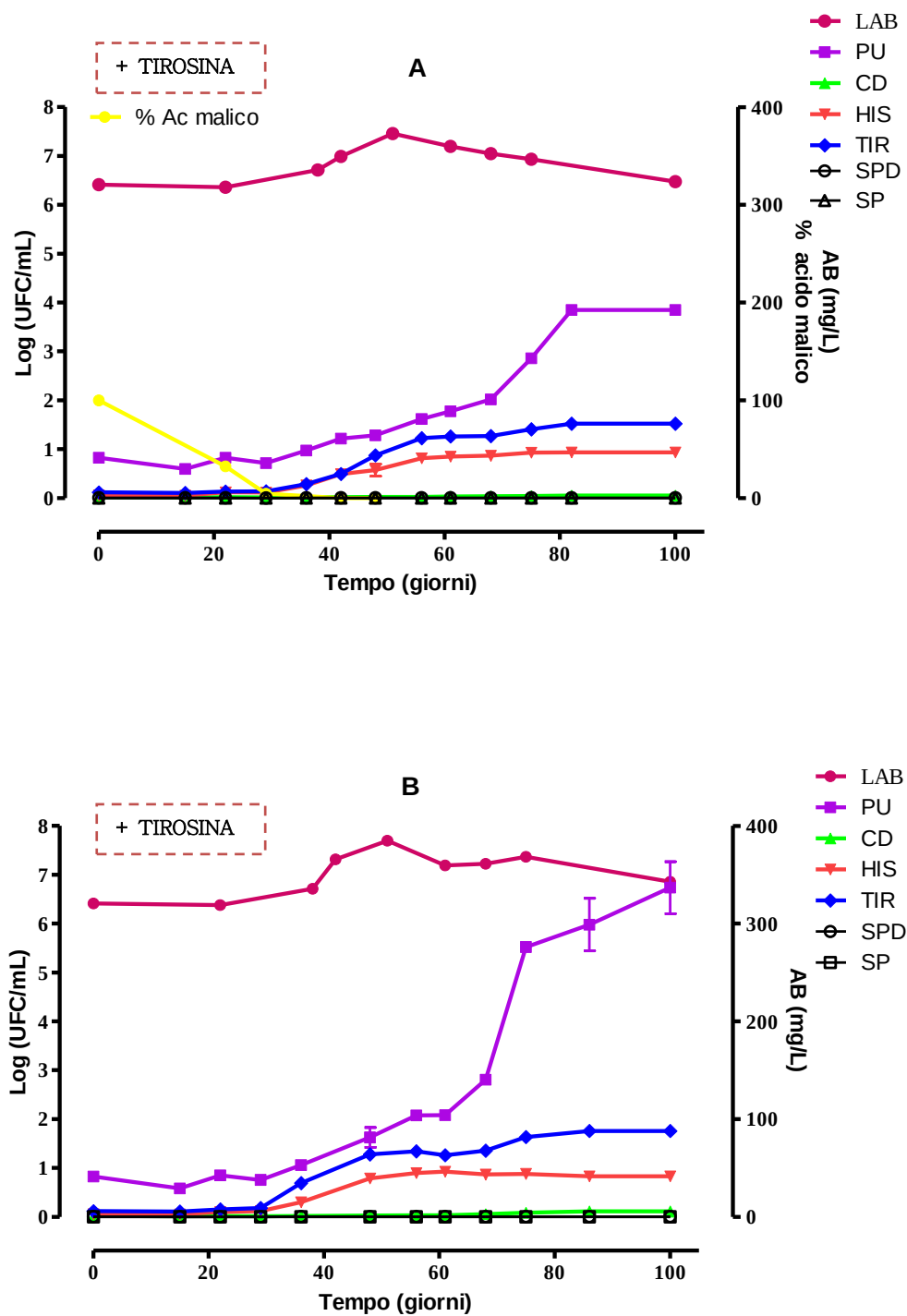
- 2 aliquote integrate con 100 mgL⁻¹ di istidina e 100 mgL⁻¹ di tirosina
- 2 aliquote integrate con 100 mgL⁻¹ di istidina,
- 2 aliquote integrate con 100 mgL⁻¹ di istidina e 1 gL⁻¹ di acido malico
- 2 aliquote integrate con 100 mgL⁻¹ di tirosina
- 2 aliquote integrate con 100 mgL⁻¹ di tirosina e 1 gL⁻¹ di acido malico
- 2 aliquote senza integrazioni

A ciascuna coltura sono state aggiunte streptomicina e pimarcina per impedire rispettivamente lo sviluppo di

batteri acetici e lieviti e la loro efficacia è stata verificata mediante semina sui mezzi di coltura WL e LF precedentemente descritti. Le colture sono state allestite in anaerobiosi sostituendo l'aria con azoto e sono state incubate a 20°C. Ogni settimana per circa tre mesi sono state eseguite conte vitali per monitorare la cinetica della popolazione lattica e analisi HPLC per quantificare il rilascio di AB. Nelle tesi in cui era presente acido malico sono state eseguite anche analisi enzimatiche per monitorare lo svolgimento della fermentazione malolattica. Tutte le analisi sono state eseguite in doppio.

I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 2.45- 2.47 come media e deviazione standard delle due prove allestite per ciascuna condizione. La popolazione microbica in tutte le condizioni saggiate si è dimostrata in grado di crescere incrementando di circa un ordine di grandezza. Per verificare la presenza di *O. oeni* in tutte le prove, dalle piastre di MRS in alcuni punti delle varie cinetiche (0, 60 e 111 giorni) sono state prelevate un numero significativo di colonie e su di esse è stata eseguita la PCR specie-specifica sopra descritta. Tutti gli isolati saggiati hanno dimostrato di appartenere alla specie *O. oeni*.

Per quanto riguarda la formazione di AB, è possibile osservare come, in tutte le condizioni saggiate, la produzione di AB iniziasse dopo circa un mese di incubazione e più precisamente quando la popolazione di *O. oeni* cominciava a crescere. I rilasci di tiramina e istamina non erano influenzati significativamente dalla disponibilità o meno di acido malico. A parità di concentrazione dei precursori, infatti, nessuna differenza statisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$) è stata riscontrata nel contenuto di istamina e di tiramina in presenza o assenza di acido malico (Figure 2.45 e 2.46). La coltura allestita senza integrazioni (figura 2.47) mostrava incrementi significativi solamente a carico di putrescina e istamina, ma non di tiramina.



*Figura 2.45: Cinetica delle popolazioni di *O. oeni* e del rilascio di AB in presenza di tirosina e acido malico (A) e in presenza soltanto di tirosina (B).*

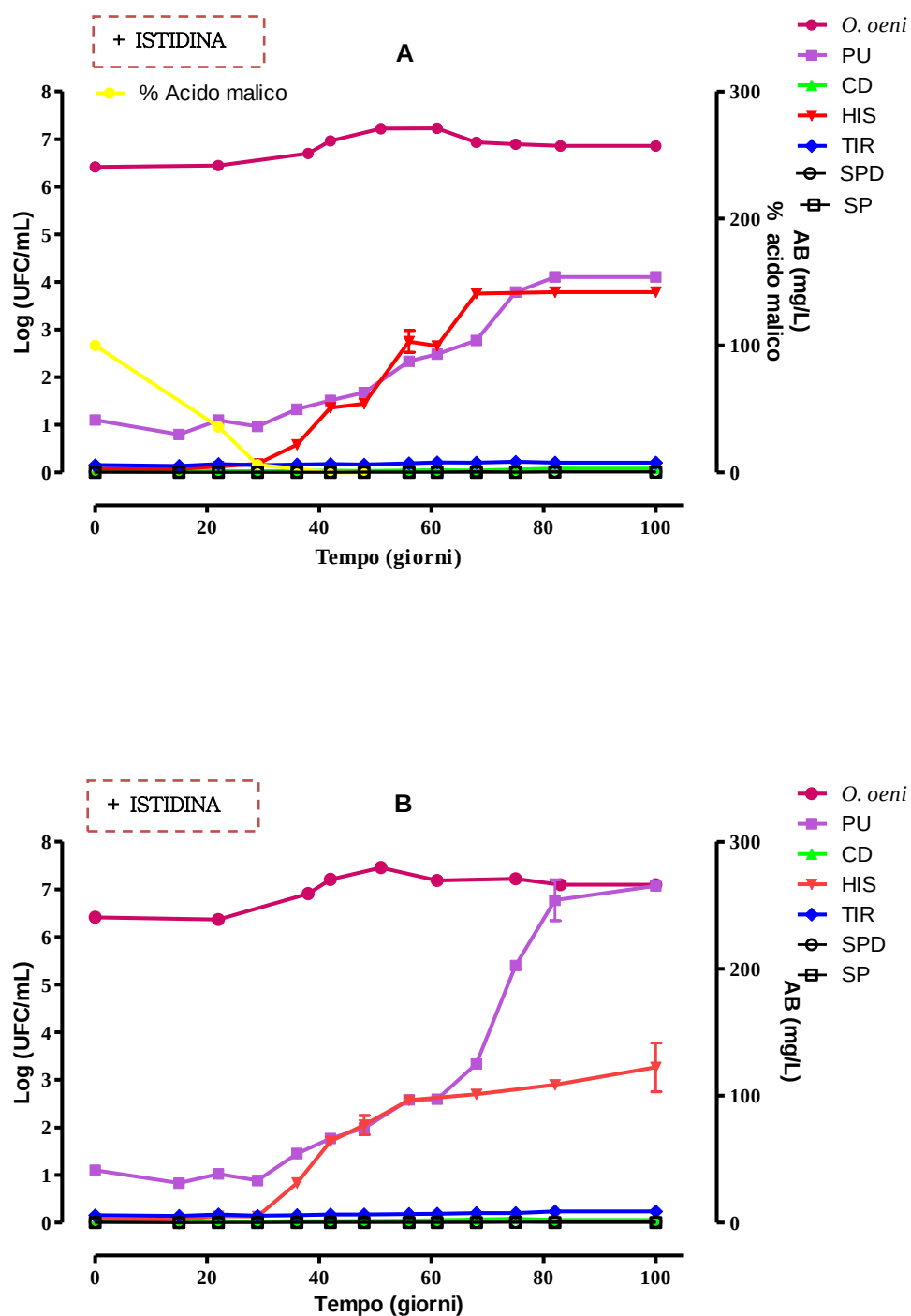


Figura 2.46: Cinetica delle popolazioni di *O. oeni* (LAB) e del rilascio di AB (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) in presenza di istidina e acido malico (A) e in assenza soltanto di istidina (B).

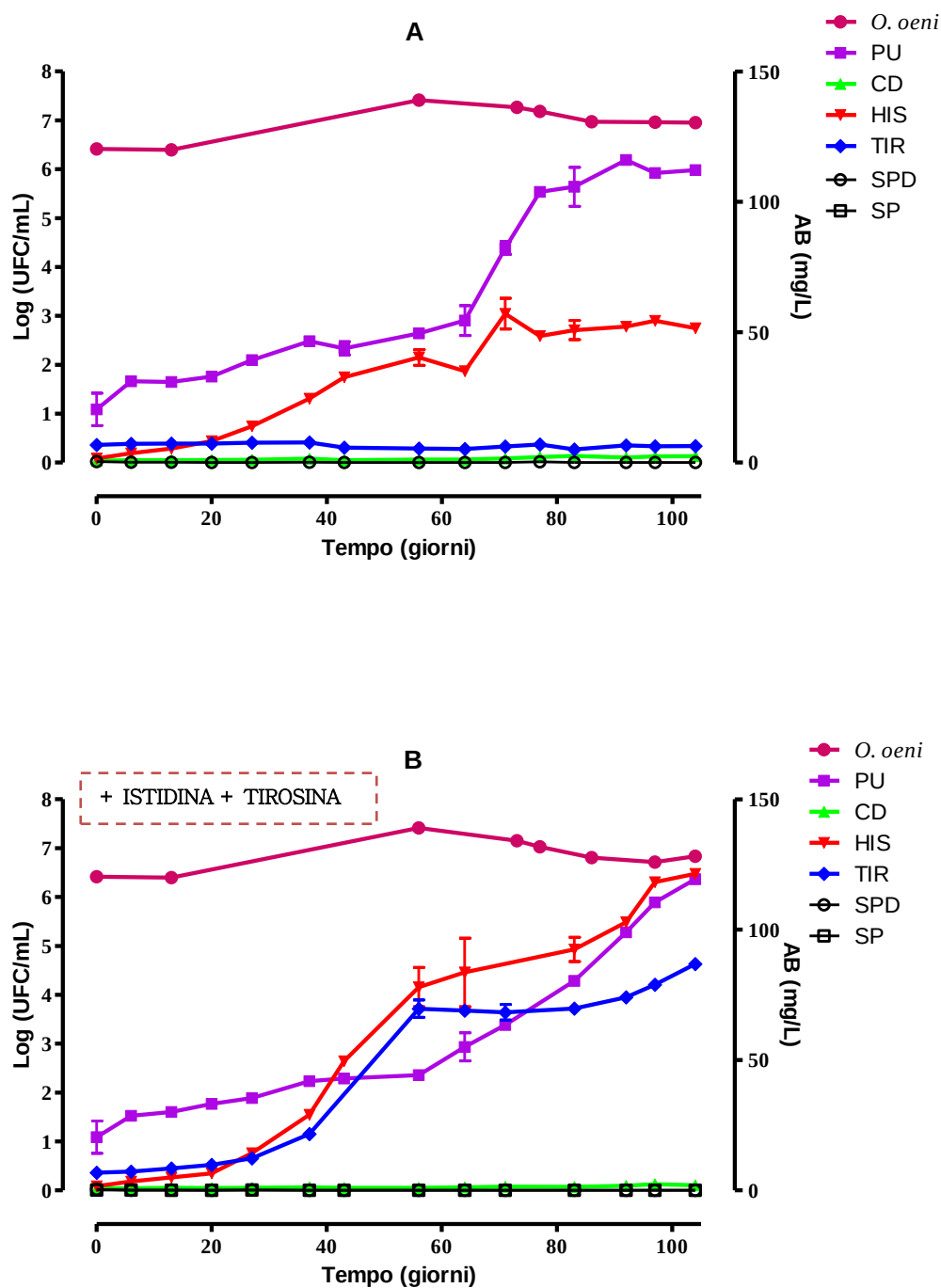


Figura 2.47. Cinetica delle popolazioni di *O. oeni* (LAB) e del rilascio di AB: (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) in assenza (A) e in presenza (B) degli aminoacidi precursori di istamina e tiramina (istidina e tirosina).

Le colture che erano state integrate con istidina e/o tirosina (fig. 2.47B) mostravano al termine della prova un contenuto maggiore di istamina e/o tiramina rispetto a quella senza integrazioni (fig. 2.47A) e la differenza tra queste due concentrazioni era stechiometricamente uguale alla quantità dei precursori aggiunti. Infatti, i 100 mgL^{-1} di istidina aggiunti, se completamente decarbossilati, sarebbero dovuti corrispondere a 70 mgL^{-1} di istamina. Nella prova in cui non sono stati aggiunti gli aminoacidi precursori (fig. 2.47A) è stata trovata una concentrazione di istamina pari a circa 50 mgL^{-1} , mentre nelle prove a cui l'istidina era aggiunta, tale concentrazione risultava incrementata esattamente della quantità attesa dall'integrazione, lasciando supporre che tutta l'istidina a disposizione fosse stata decarbossilata.

Analogamente, la produzione di tiramina attesa, se tutta la tirosina aggiunta (100 mgL^{-1}) fosse stata decarbossilata, sarebbe stata di 76 mgL^{-1} ed, in effetti, l'incremento di tiramina osservato in tutte le prove in cui la tirosina era stata aggiunta risultava intorno a questa quantità. Ciò significa che la popolazione lattica presente era capace di utilizzare completamente i precursori disponibili per formare istamina e tiramina. Nessuna differenza statisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$) è stata riscontrata tra il rilascio di AB osservato quando gli aminoacidi precursori erano aggiunti singolarmente oppure insieme. Pertanto, è possibile affermare che il rilascio di istamina e tiramina osservato sia semplicemente funzione della disponibilità dell'aminoacido precursore.

Per quanto riguarda la formazione di putrescina, occorre sottolineare che in nessuna prova è stato aggiunto l'aminoacido precursore e che quindi la sua cinetica di formazione potrebbe essere funzione del rilascio sia dell'arginina che dell'ornitina da parte delle molte cellule di lievito morte che si trovano nelle fecce. In ogni caso, i risultati ottenuti fanno ipotizzare che la presenza di acido malico porti ad una

riduzione della sua formazione (figure 2.45 e 2.46), mentre la presenza di uno solo dei due aminoacidi precursori delle altre due AB, sembra determinare un aumento significativo della produzione di putrescina (figure 2.45–2.47)

Dai risultati fin qui ottenuti si evidenzia che:

- la disponibilità o meno di acido malico non influenza la capacità di *O. oeni* di formare AB.
- la produzione di AB è strettamente dipendente dalla disponibilità degli aminoacidi precursori e dallo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni* presente in vino che a densità cellulari adeguate è capace di formare AB fino ad esaurire i precursori disponibili (Figura 2.42).
- se le cellule batteriche non si trovano in un adeguato stato fisiologico, la disponibilità degli aminoacidi precursori non determina alcuna produzione di AB (Figura 2.43).

Alla luce di queste osservazioni appare che:

- l'influenza dei fattori nutrizionali sul rilascio di AB sembra secondaria rispetto a quella di fattori che possono influenzare lo stato fisiologico della cellula.
- Pertanto, nel disegno sperimentale previsto in fase di attuazione del progetto sono state inserite come variabili solo i fattori intrinseci che in vino influenzano maggiormente la fisiologia dei microrganismi ossia il **pH** e l'**etanolo**.

2.3.7. Studio dell'influenza del pH e dell'etanolo sulla produzione di AB da parte di *O. oeni* mediante un disegno sperimentale composito centrale

Per studiare come fattori intrinseci, quali il pH e l'etanolo, siano in grado di influenzare la formazione di AB in vino, è stato costruito un disegno sperimentale che ha consentito di valutare l'effetto interattivo di queste due variabili.

Il disegno sperimentale scelto è stato quello composito centrale con:

$$K=2 \text{ variabili: } 2^K + 2K + 2 = 10 \text{ combinazioni}$$

Le combinazioni calcolate per le due variabili sono quelle riportate in tabella 2.17.

La prima combinazione della tabella è stata ripetuta in doppio (Prova 1 e 2). Il mezzo di base utilizzato per la prova era MRS modificato in modo tale da simulare la composizione chimica del vino (2 gL^{-1} di acido malico, 1 gL^{-1} di glucosio, 1 gL^{-1} di fruttosio, 100 mgL^{-1} istidina, 100 mgL^{-1} di tirosina) integrato con 2 gL^{-1} di Tomato Juice.

Il pH e l'etanolo nel mezzo sono stati variati per ciascuna prova secondo quanto riportato in tabella 2.17. Le 10 prove sono state allestite inoculando 10 mL di vino feccioso in 90 mL di mezzo sintetico in condizioni di anaerobiosi sostituendo l'aria con l'azoto. Le colture sono state incubate a 20°C .

Ad intervalli regolari per circa due mesi sono state eseguite conte vitali su MRS pH 4,8 integrato con 2 gL^{-1} di Tomato Juice per seguire gli andamenti della popolazione di *O. oeni* e analisi HPLC per quantificare il rilascio di AB. Analisi enzimatiche per quantificare l'acido malico presente sono state eseguite per monitorare l'andamento della fermentazione malolattica. Tutte le analisi sono state

eseguite in doppio. Reazioni di PCR specie-specifica sono state eseguite per confermare la sola presenza di *O. oeni* durante lo svolgimento di tutte le prove.

Tabella 2.17 *Combinazione delle variabili nel disegno sperimentale composito centrale.*

Prova	pH	% Etanolo (V/V)
1 e 2	3,6	12
3	3,6	8
4	3,6	16
5	3,8	10
6	3,8	14
7	3,4	10
8	3,4	14
9	3,2	12
10	4,0	12

Nelle figure 2.48-2.52 sono riportate le cinetiche di crescita di *O. oeni* e le cinetiche di produzione delle diverse AB (istamina, tiramina, putrescina, spermina, spermidina, feniletilamina) da parte di questa popolazione microbica.

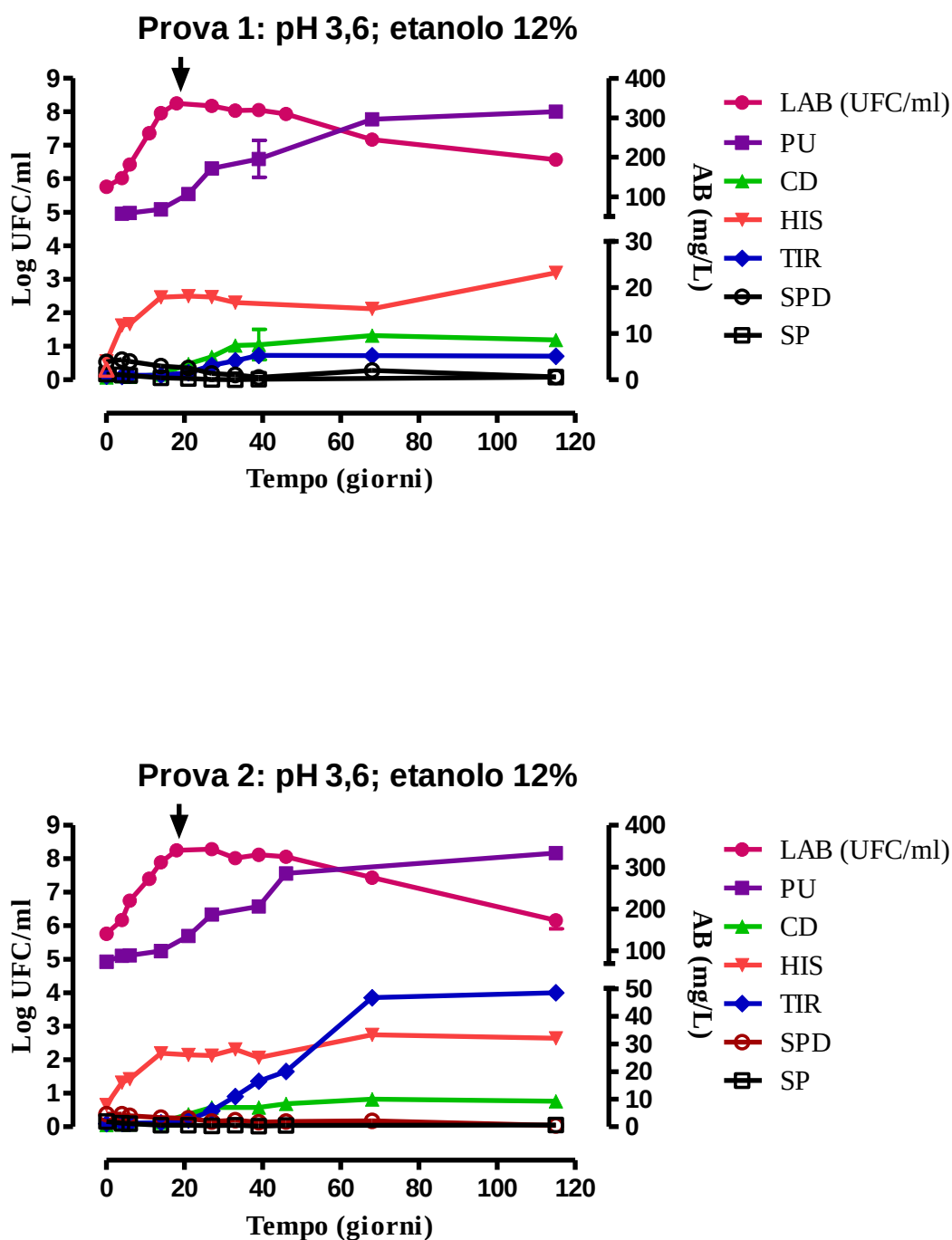


Figura:2.48. Cinetiche di crescita di *O. oeni* (LAB) e di produzione di AB (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) nelle prove 1 e 2; le frecce indicano la fine della fermentazione malolattica.

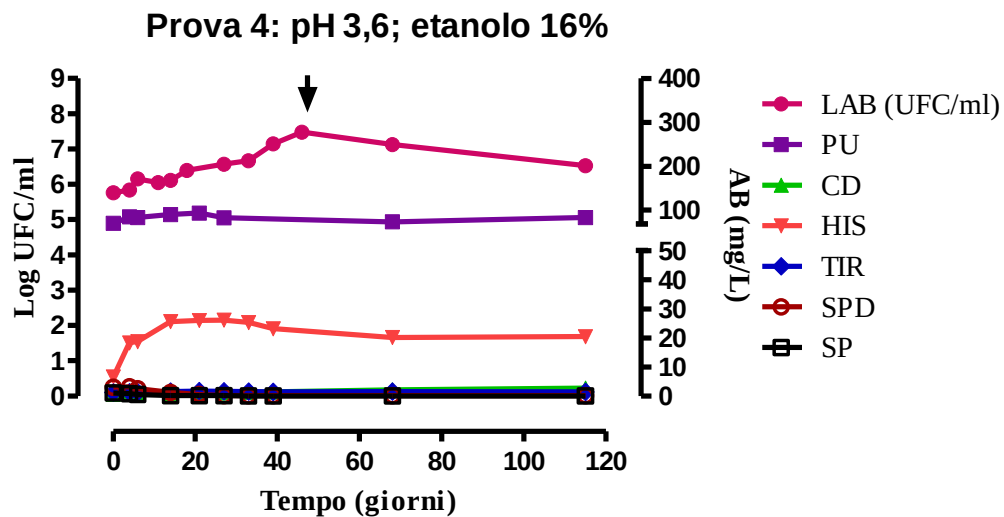
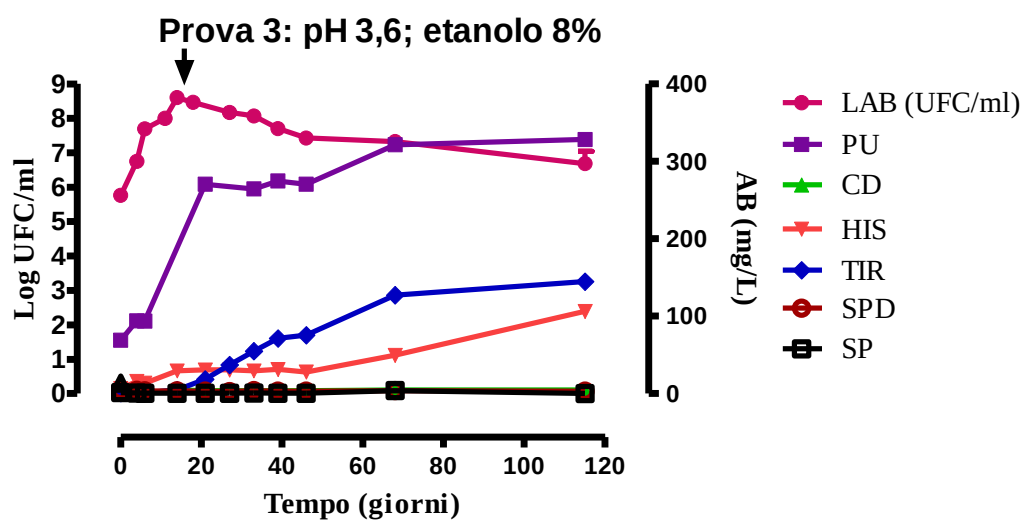


Figura:2.49. Cinetiche di crescita di *O. oeni* (LAB) e di produzione di AB (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) nelle prove 3 e 4; le frecce indicano la fine della fermentazione malolattica

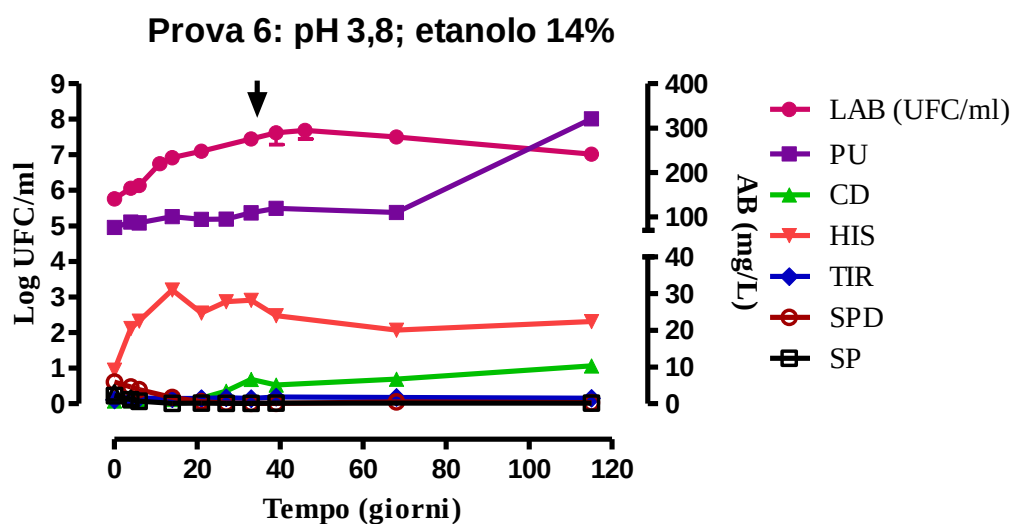
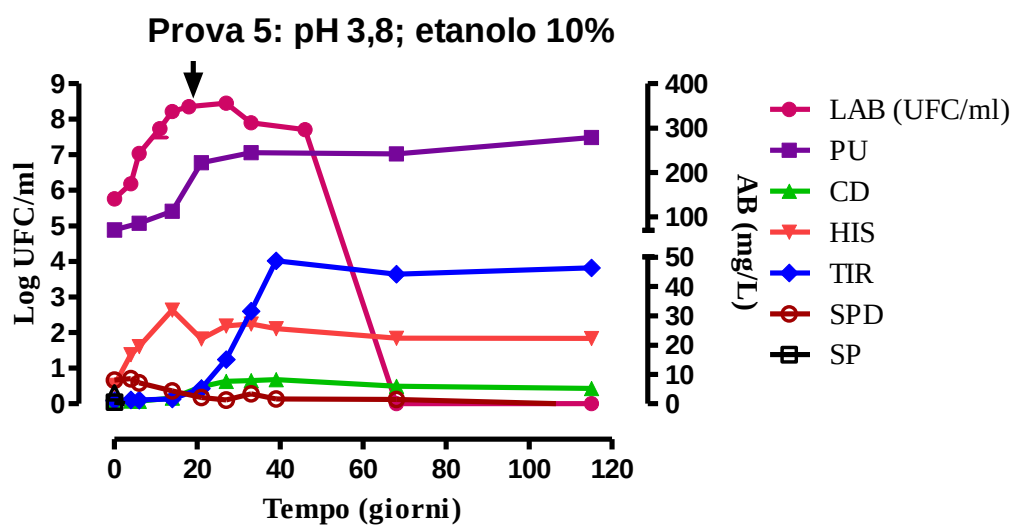


Figura 2.50. Cinetiche di crescita di *O. oeni* (LAB) e di produzione di AB (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) nelle prove 5 e 6; le frecce indicano la fine della fermentazione malolattica.

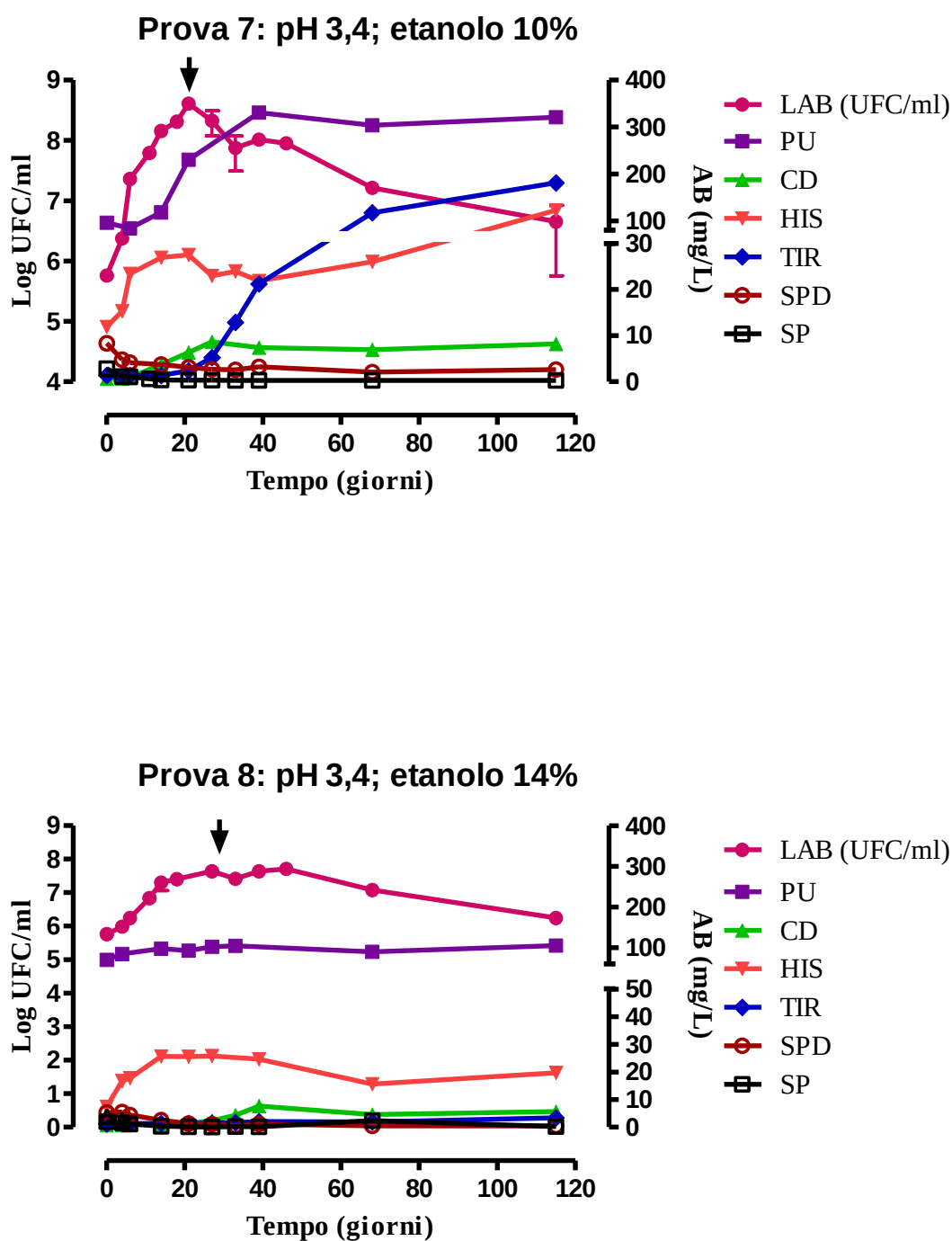


Figura 2.51. Cinetiche di crescita di *O. oeni* (LAB) e di produzione di AB (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) nelle prove 7 e 8; le frecce indicano la fine della fermentazione malolattica.

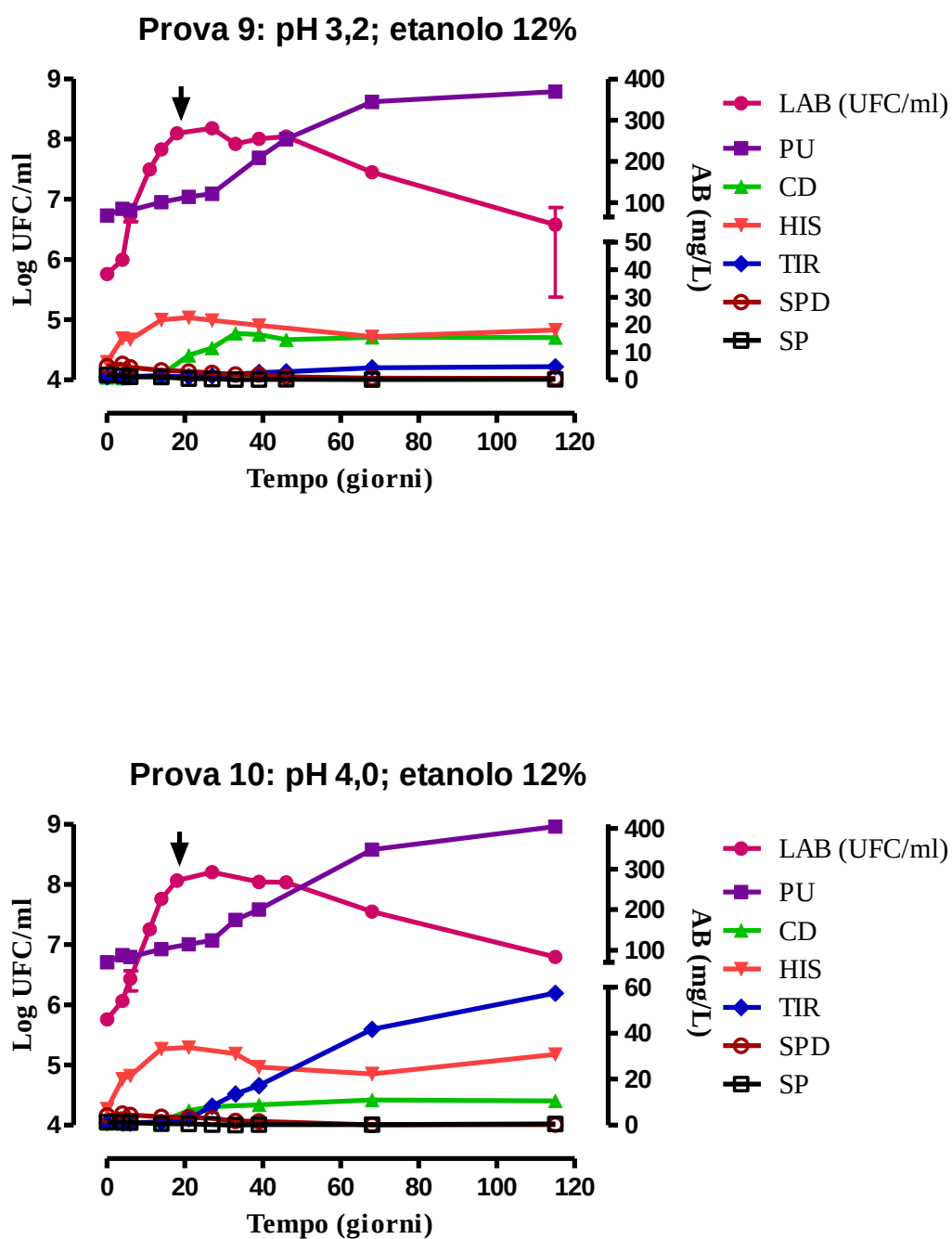


Figura 2.52. Cinetiche di crescita di *O. oeni* (LAB) e di produzione di AB (PU, putrescina; CD, cadaverina; HIS, istamina; TIR, tiramina; SPD, spermidina; SP, spermina) nelle prove 9 e 10; le frecce indicano la fine della fermentazione malolattica.

Le cinetiche di produzione della feniletilamina non sono state riportate nel grafico dato che le variazioni riscontrate non sono risultate mai significative.

Tutte le prove hanno mostrato la crescita di *O. oeni* con cinetiche caratteristiche per ciascuna condizione. Il valori del Log delle UFCmL⁻¹ stimati rispetto al tempo nelle diverse condizioni, sono stati elaborati secondo l'equazione di Gompertz (software GraphPad Prism 5):

$$Y = N_0 + C \cdot \exp(-\exp((2.718 \cdot \mu / C) \cdot (\text{Lag} - X) + 1))$$

Dove:

Y = Log (UFCmL⁻¹)

X = tempo

C = rendimento di crescita

N₀ = numero iniziale di cellule

Lag = durata della fase lag

μ = massima velocità di crescita specifica

I risultati ottenuti per i diversi parametri relativi alla crescita (velocità di crescita, rendimento di crescita e durata della fase Lag) sono riportati in tabella 2.18 insieme alla bontà del fit dei dati sperimentali rispetto all'equazione di Gompertz. Dall'analisi dei risultati è possibile osservare come i valori di R² delle diverse prove abbiano mostrato valori ottimali, essendo tutti prossimi ad 1 e più precisamente compresi tra 0,8943 e 0,9966, a sottolineare la correttezza della scelta dell'equazione di Gompertz per descrivere le cinetiche di crescita di *O. oeni* nelle condizioni sperimentali scelte. Dalla stessa tabella è possibile osservare anche come la velocità di crescita sembri inversamente correlata con la quantità di etanolo ma non con il pH. Infatti, le velocità di crescita più elevate sono risultate quelle ottenute per la prova 3 e 7 che mostravano il più basso contenuto di etanolo (8 e 10% v/v rispettivamente).

Tabella 2.18.

Valori che fittano meglio in relazione all'equazione di Gompertz										
	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Prova 4	Prova 5	Prova 6	Prova 7	Prova 8	Prova 9	Prova 10
Cellule iniziali (LogUFC/mL)	5,741	5,530	5,737	6,058	5,699	5,693	5,749	5,747	5,716	5,703
Rendimento di crescita (LogUFC/mL)	2,891	3,240	2,699	1,251	2,730	1,949	2,404	1,915	2,423	2,773
Velocità di crescita massima (LogUFC/mL/tempo)	0,2155	0,1811	0,4230	0,1136	0,2661	0,1055	0,4256	0,1413	0,2400	0,1836
Durata della fase lag (tempo)	3,060	0,007660	1,448	27,10	1,688	1,214	2,373	2,626	2,399	2,087
Errori standard										
Cellule iniziali	0,05688	0,2618	0,1677	0,05111	0,1526	0,2200	0,1202	0,08302	0,09912	0,07477
Rendimento di crescita	0,1605	0,5777	0,2170	0,1199	0,2649	0,3540	0,1497	0,2205	0,1826	0,2046
Velocità di crescita massima	0,01111	0,01771	0,1130	0,04136	0,04225	0,01629	0,09103	0,01534	0,03007	0,01081
Durata della fase lag	0,4622	2,017	1,076	2,319	1,034	3,047	0,6264	1,001	0,7268	0,6988
Intervallo di confidenza del 95%										
Cellule iniziali	5.610 - 5.872	4.927 - 6.134	5.351 - 6.124	5.951 - 6.164	5.347 - 6.051	5.214 - 6.173	5.471 - 6.026	5.556 to 5.939	5.488 to 5.945	5.527 to 5.880
Rendimento di crescita	2.521 - 3.261	1.908 - 4.573	2.199 to 3.200	1.001 to 1.501	2.119 to 3.340	1.178 to 2.721	2.059 to 2.750	1.406 to 2.423	2.002 to 2.845	2.289 to 3.256
Velocità di crescita massima	0.1898 - 0.2411	0.1403 - 0.2219	0.1624 to 0.6837	0.02733 to 0.1999	0.1687 to 0.3636	0.06998 to 0.1410	0.2157 to 0.6355	0.1059 to 0.1767	0.1706 to 0.3093	0.1580 to 0.2092
Durata della fase lag	1.994 - 4.126	-4.658 to 4.643	-1.034 to 3.931	22.26 to 31.94	-0.6955 to 4.072	-5.426 to 7.853	0.9286 to 3.818	0.3172 to 4.935	0.7225 to 4.075	0.4349 to 3.740
Bontà del Fit										
Gradi di libertà	8	8	8	20	8	12	8	8	8	7
R ²	0,9966	0,9897	0,9721	0,8943	0,9819	0,9540	0,9781	0,9859	0,9871	0,9964
Somma assoluta dei quadrati	0,03685	0,09991	0,3355	0,7411	0,2096	0,2984	0,2289	0,06723	0,1228	0,03070
Sy.x	0,06787	0,1118	0,2048	0,1925	0,1619	0,1577	0,1692	0,09167	0,1239	0,06623

Viceversa le prove che hanno presentato velocità di crescita significativamente più basse sono state quelle con i più elevati contenuti di etanolo (prova 4, 6 e 8 contenenti, rispettivamente, 16%, 14% e 14% di etanolo).

Le rimanenti prove (1, 2, 5, 9, 10) hanno mostrato velocità di crescita intermedie a quelle appena descritte e contenuti di etanolo compresi tra 10 e 12 gradi alcolici. Viceversa a valori di pH molto diversi corrispondevano velocità di crescita non significativamente diverse tra loro, come riportato per le prove 1, 2, 5, 9, e 10 che mostravano la stessa velocità di crescita in condizioni di pH che andavano da 3,2 a 4,0. In tutte le prove la durata della fase lag è risultata compresa tra 0 e 3 giorni, ad eccezione della prova 4 che ha presentato una durata di circa 27 giorni. I rendimenti di crescita non sono risultati significativamente diversi in nessuna delle prove saggiate. Infine, è stata calcolata la capacità della popolazione di *O. oeni* di persistere al variare del contenuto di pH ed etanolo. Per fare ciò è stata calcolata l'area sotto la curva di ciascuna delle cinetiche di crescita ottenute nelle varie prove e i dati ottenuti sono riportati nella tabella 2.19 (A e B). I valori più bassi di persistenza sono stati riscontrati per le prove 4 e 5. La prova 4 è risultata quella con la concentrazione di etanolo più elevata (16%) e questo può spiegare la minor persistenza della popolazione batterica. La bassa persistenza osservata nella prova 5 risulta invece difficilmente spiegabile, considerate le condizioni di pH e etanolo presenti pari, rispettivamente a 3,8 e 10% (v/v).

Per quanto riguarda invece le AB, è possibile osservare come, in tutte le condizioni saggiate, i livelli di spermina e spermidina fossero scarsamente significativi a differenza di quelli di putrescina istamina e tiramina. In particolare, la putrescina incrementava con cinetiche simili per 60 giorni in tutte le prove ad eccezione di quelle con i contenuti di etanolo più elevati (prova 4, prova 6, prova 8) dove la putrescina rimaneva praticamente costante.

Tabella 2.19 Area calcolata come integrale della curva che descrive la cinetica di crescita e di morte di *O. oeni* nelle prove allestite. (A) 0 prove da 1 a 5 e (B)= prove da 6 a 10

X è l'ascissa che riporta il tempo, *Y* l'ordinata che riporta il Log (UFC/mL).

A)

	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Prova 4	Prova 5
Valore massimo di X	115,0	115,0	115,0	115,0	115,0
Valore di X in cui Y è massimo	18,00	27,00	14,00	46,00	27,00
Valore massimo raggiunto da Y	8,253	8,283	8,605	7,480	8,451
Area sottostante la curva	839,7	843,7	831,5	779,4	618,6

B)

	Prova 6	Prova 7	Prova 8	Prova 9	Prova 10
Valore massimo di X	115,0	115,0	115,0	115,0	115,0
Valore di X in cui Y è massimo	27,00	21,00	46,00	27,00	27,00
Valore massimo raggiunto da Y	7,908	8,613	7,715	8,184	8,206
Area sottostante la curva	836,9	851,2	804,7	848,6	854,8

Nella prova 6 è stato registrato un sorprendente incremento di putrescina di circa 200 mgL^{-1} nei successivi 50 giorni di monitoraggio.

L'istamina è aumentata in tutte le prove quasi unicamente durante la fase esponenziale di crescita con intensità diverse in base alle condizioni sperimentali, mentre l'incremento di tiramina è stato registrato prevalentemente durante la fase stazionaria e spesso anche nelle prime fasi di quella di morte. Come per la putrescina anche per istamina e tiramina in alcune prove al termine della sperimentazione sono stati rilevati degli incrementi improvvisi di concentrazione. In particolare, nelle prove 3 e 7 l'istamina ha subito un ulteriore incremento negli ultimi 50 giorni, così come la tiramina nella prova 7.

Per comprendere meglio i meccanismi di produzione e rilascio delle diverse AB in funzione dei parametri intrinseci presi in esame, i dati ottenuti sono stati elaborati statisticamente in tre momenti diversi:

1. Al raggiungimento della fase stazionaria precoce (fine della fermentazione malolattica);
2. In fase stazionaria avanzata;
3. In fase di morte (115 giorni dall'inoculo).

I dati sono stati elaborati conducendo indagini di correlazione lineare utilizzando il coefficiente di Pearson. Il programma impiegato per la trattazione statistica è stato Statistica 7.

1. Le correlazioni al termine della **fase stazionaria precoce** tra velocità e rendimento di crescita di *O. oeni*, pH, etanolo e concentrazione delle diverse AB sono riportate nella matrice di correlazione in tabella 2.20 e mostrate graficamente in figura 2.53. La produzione di putrescina, tiramina e spermidina è risultata direttamente correlata con la velocità di crescita (+0,93, +0,90 e +0,82 rispettivamente): maggiore è la velocità di crescita,

maggiore è il rilascio di queste tre AB. Al contrario la quantità di etanolo presente nella coltura è inversamente correlata con la velocità di crescita ($-0,89$) e conseguentemente anche con la produzione di putrescina, tiramina e spermidina ($-0,87$, $-0,77$ e $-0,81$ rispettivamente). Putrescina e tiramina sono risultate direttamente correlate tra loro ($+0,94$). Il rendimento di crescita non è risultato correlato né con il rilascio delle diverse AB, né con il pH, ma una certa correlazione è stata evidenziata con il contenuto di etanolo ($-0,69$). I rilasci di cadaverina, istamina e spermina in fase stazionaria precoce non sembrano correlati con nessuna delle variabili prese in esame.

- 2 L'indagine condotta in **fase stazionaria tardiva** ha mostrato in sostanza gli stessi risultati per i rilasci di putrescina e tiramina (tabella 2.21, figura 2.53) che risultavano direttamente correlati alla velocità di crescita ($+0,72$ per entrambi) e inversamente correlati all'etanolo ($-0,79$ e $-0,85$ rispettivamente). Come già evidenziato nella fase stazionaria precoce, la produzione di cadaverina, istamina e spermina non è risultata correlata con nessuna delle variabili prese in esame. Alcune differenze tra fase stazionaria precoce e tardiva invece sono state riscontrate a carico di spermidina e putrescina: la spermidina non è risultata più correlata né con la velocità di crescita, né con l'etanolo, mentre il rilascio di putrescina è risultato direttamente correlato con il rendimento di crescita ($+0,75$).
3. Infine, una indagine di correlazione è stata condotta anche durante la **fase di morte** prendendo in esame le correlazioni tra persistenza di *O. oeni*, etanolo, pH e rilascio delle diverse AB (tabella 2.2, figura 2.54). La correlazione evidenziata in fase di morte tra tiramina e etanolo è risultata praticamente la stessa di quella osservata in fase stazionaria precoce o tardiva.

Tabella 2.20. Matrice di correlazione ricavata dai dati sperimentali ottenuti in fase stazionaria precoce.

Matrice di correlazione FASE STAZIONARIA PRECOCE										
	Rendimento	velocità di crescita	etanolo	pH	Putrescina	Cadaverina	Istamina	Tiramina	Spermidina	Spermina
Rendimento	1,00	0,39	-0,69	0,18	0,38	0,44	0,20	0,28	0,62	-0,69
velocità di crescita	0,39	1,00	-0,89	-0,25	0,93	0,35	0,05	0,90	0,82	-0,33
etanolo	-0,69	-0,89	1,00	-0,00	-0,87	-0,44	-0,23	-0,77	-0,81	0,58
pH	0,18	-0,25	-0,00	1,00	-0,09	-0,13	0,53	-0,04	-0,15	0,00
Putrescina	0,38	0,93	-0,87	-0,09	1,00	0,26	0,22	0,94	0,68	-0,31
Cadaverina	0,44	0,35	-0,44	-0,13	0,26	1,00	0,29	0,25	0,46	-0,47
Istamina	0,20	0,05	-0,23	0,53	0,22	0,29	1,00	0,35	0,20	-0,33
Tiramina	0,28	0,90	-0,77	-0,04	0,94	0,25	0,35	1,00	0,74	-0,21
Spermidina	0,62	0,82	-0,81	-0,15	0,68	0,46	0,20	0,74	1,00	-0,39
Spermina	-0,69	-0,33	0,58	0,00	-0,31	-0,47	-0,33	-0,21	-0,39	1,00

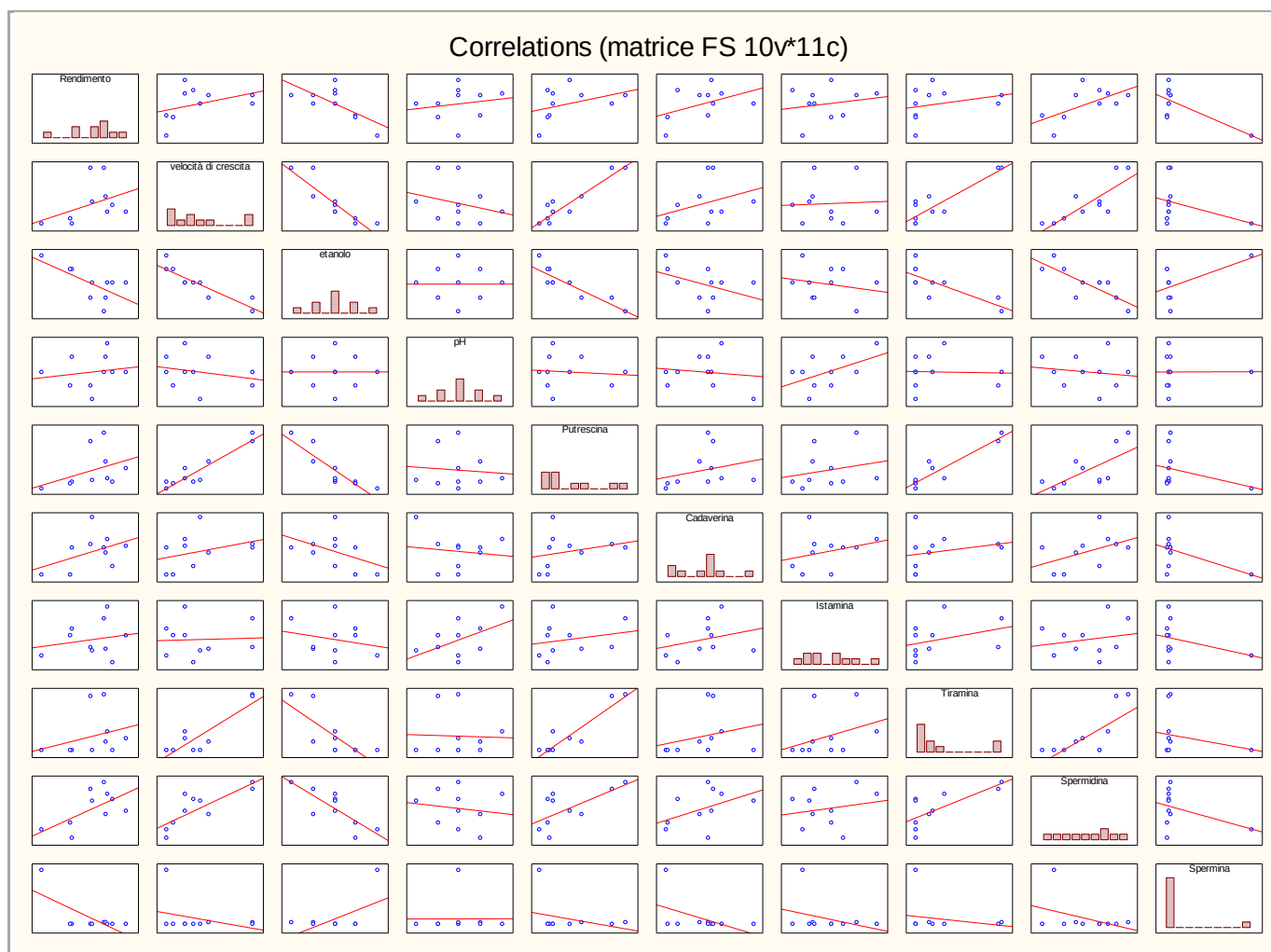


Figura 2.53. Rette di correlazione calcolate tra le variabili considerate in fase stazionaria precoce

Tabella 2.21. Matrice di correlazione ricavata dai dati sperimentali ottenuti in fase stazionaria tardiva

Matrice di correlazione FASE STAZIONARIA TARDIVA										
	velocità di crescita	rendimento	etanolo	pH	Putrescina	Cadaverina	Istamina	Tiramina	Spermidina	Spermina
velocità di crescita	1,00	0,39	-0,89	-0,25	0,72	0,00	0,24	0,72	0,22	-0,42
rendimento	0,39	1,00	-0,69	0,18	0,75	0,40	-0,05	0,48	0,36	-0,60
etanolo	-0,89	-0,69	1,00	-0,00	-0,79	-0,13	-0,29	-0,85	-0,37	0,46
pH	-0,25	0,18	-0,00	1,00	-0,01	-0,26	0,15	0,24	-0,28	0,38
Putrescina	0,72	0,75	-0,79	-0,01	1,00	0,31	0,22	0,63	0,35	-0,48
Cadaverina	0,00	0,40	-0,13	-0,26	0,31	1,00	0,04	-0,24	0,53	-0,50
Istamina	0,24	-0,05	-0,29	0,15	0,22	0,04	1,00	0,51	0,66	-0,08
Tiramina	0,72	0,48	-0,85	0,24	0,63	-0,24	0,51	1,00	0,33	-0,10
Spermidina	0,22	0,36	-0,37	-0,28	0,35	0,53	0,66	0,33	1,00	-0,54
Spermina	-0,42	-0,60	0,46	0,38	-0,48	-0,50	-0,08	-0,10	-0,54	1,00

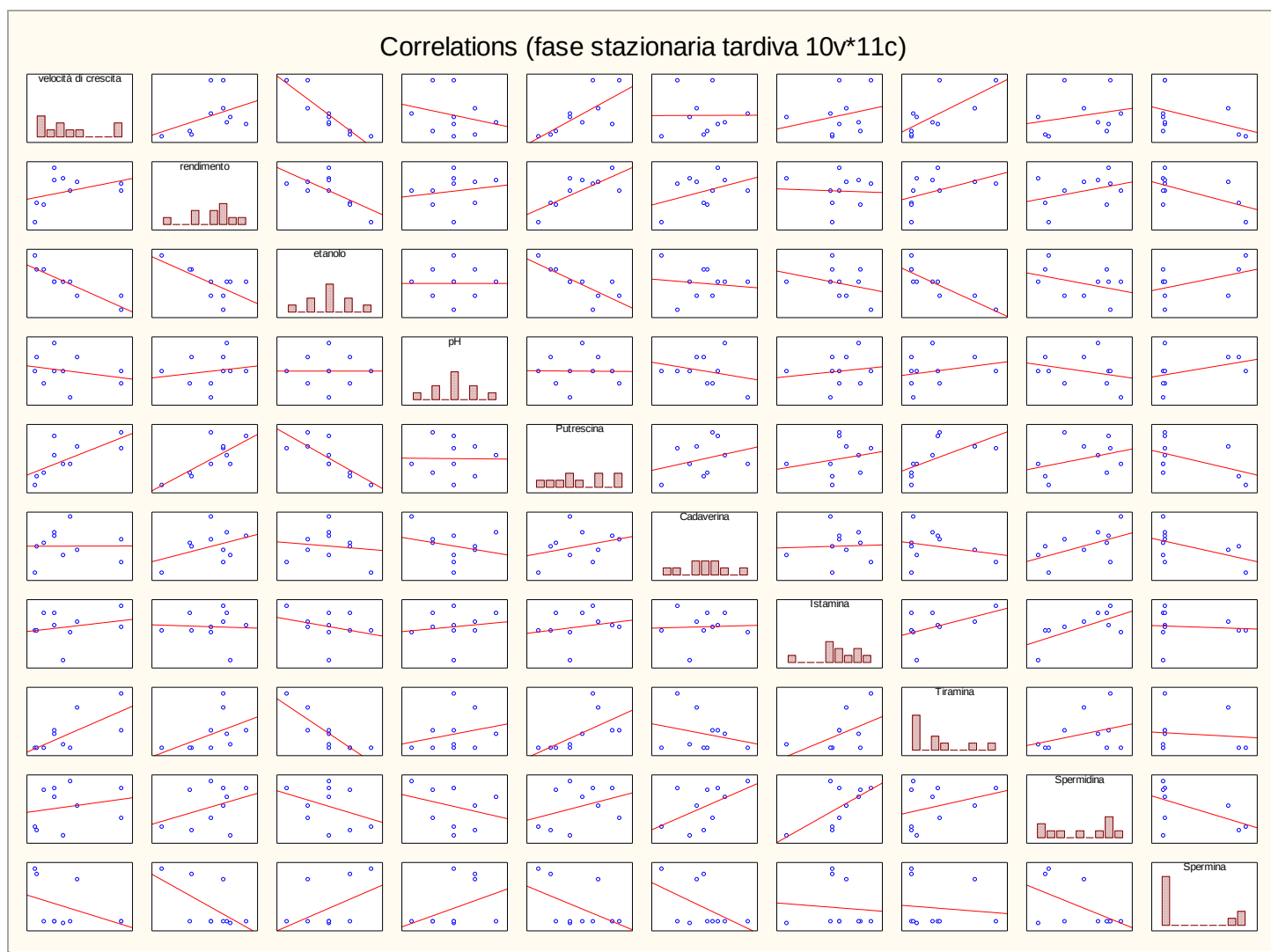


Figura 2.54. Rette di correlazione calcolate tra le variabili considerate in fase stazionaria tardiva

Tabella 2.22. Matrice di correlazione ricavata dai dati sperimentali ottenuti in fase stazionaria tardiva

Matrice di correlazione FASE DI MORTE									
	Persistenza	Etanolo	pH	Putrescina	Cadaverina	Istamina	Tiramina	Spermidina	Spermina
Persistenza	1,00	0,09	-0,25	0,35	0,50	0,26	0,14	0,08	0,29
etanolo	0,09	1,00	-0,00	-0,63	-0,04	-0,68	-0,76	-0,78	-0,15
pH	-0,25	-0,00	1,00	0,17	-0,21	-0,18	-0,05	-0,22	0,31
Putrescina	0,35	-0,63	0,17	1,00	0,69	0,34	0,43	0,25	0,47
Cadaverina	0,50	-0,04	-0,21	0,69	1,00	-0,19	-0,17	-0,29	0,28
Istamina	0,26	-0,68	-0,18	0,34	-0,19	1,00	0,96	0,94	-0,12
Tiramina	0,14	-0,76	-0,05	0,43	-0,17	0,96	1,00	0,90	-0,00
Spermidina	0,08	-0,78	-0,22	0,25	-0,29	0,94	0,90	1,00	-0,21
Spermina	0,29	-0,15	0,31	0,47	0,28	-0,12	-0,00	-0,21	1,00

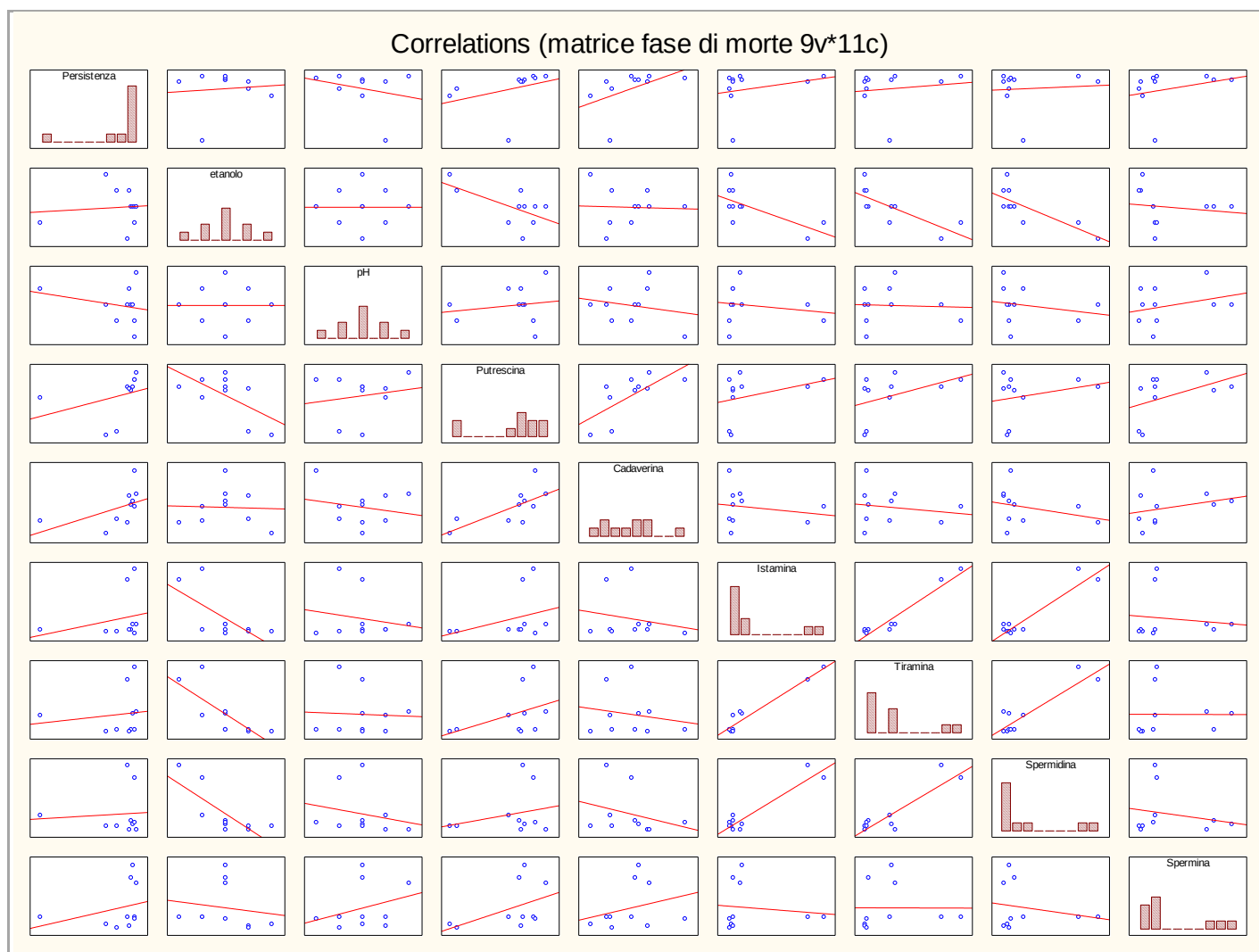


Figura 2.54. Rette di correlazione calcolate tra le variabili considerate in fase di morte cellulare

Viceversa la correlazione tra putrescina e etanolo scendeva ad un valore (-0,63) vicino a quello tra istamina e etanolo (-0,68). La persistenza della popolazione di *O. oeni* non è risultata correlata con nessuno dei rilasci delle diverse AB. Durante la fase di morte, istamina, tiramina e spermidina sono risultate direttamente correlate tra loro, mentre la putrescina non è risultata correlata con nessuna di queste AB, ma è risultata blandamente correlata con la cadaverina (+0,69). Come già evidenziato nelle fasi precedenti, la formazione di spermina non è risultata correlata con nessuna delle variabili prese in esame.

Da quanto fin qui esposto è possibile concludere che:

- Maggiore è la velocità di crescita di *O. oeni*, maggiori sono gli accumuli di tiramina e putrescina;
- La concentrazione di etanolo non è risultata correlata con la persistenza di *O. oeni*, ma si è dimostrata inversamente correlata con il rendimento di crescita, con la velocità di crescita e di conseguenza anche con la formazione di tiramina e putrescina;
- Una maggior persistenza di *O. oeni* non sembra essere correlata con un maggior rilascio delle diverse AB.
- La concentrazione di istamina osservata durante la fase stazionaria (precoce o tardiva) non è risultata correlata con nessuna delle variabili considerate, mentre è risultata strettamente correlata con quella della tiramina durante la fase di morte;
- nella fase di morte delle cellule batteriche il rilascio di istamina è risultato inversamente correlato con l'etanolo.

2.3.8. Equazioni polinomiali per descrivere la velocità di crescita di *O. oeni* in funzione del pH e dell'etanolo.

I valori di velocità di crescita riportati in tabella 2.20 sono stati elaborati con il programma Statistica 7 per

ottenere un'equazione polinomiale e il relativo grafico di superficie (figura 2.55). Lo scopo era quello di ricavare uno strumento capace di descrivere come la velocità di crescita di *O. oeni* sia influenzata dal pH e dall'etanolo.

L'equazione di secondo grado ottenuta dall'elaborazione è risultata la seguente:

$$\text{velocità di crescita} = 6,0525 - 1,5033 \cdot \text{pH} - 0,4418 \cdot \text{EtOH} + 0,0524 \cdot \text{pH}^2 + 0,0835 \cdot \text{pH} \cdot \text{EtOH} + 0,0041 \cdot \text{EtOH}^2$$

L'equazione sopra riportata può essere utilizzata anche per prevedere la velocità di crescita di *O. oeni* in un vino del quale si conosce il pH e la percentuale (v/v) di etanolo, a patto che la popolazione batterica abbia iniziato a crescere e abbia raggiunto una popolazione intorno a 10^4 - 10^5 UFC/mL.

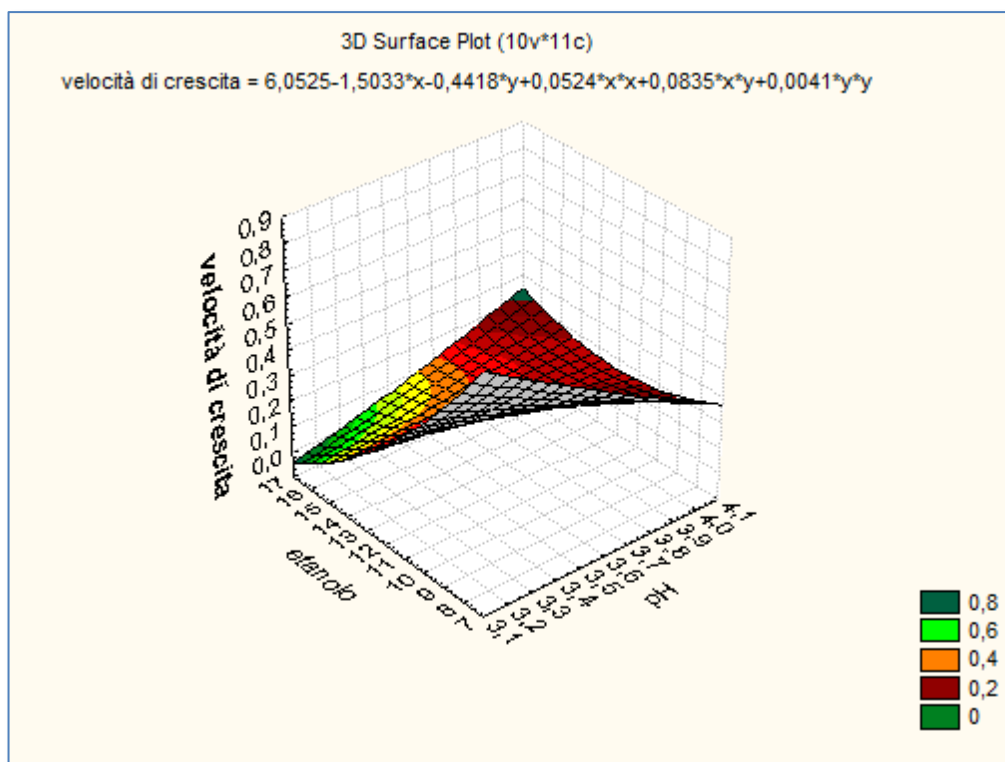


Figura 2.55: Rappresentazione grafica dell'equazione polinomiale di secondo grado che mette in relazione velocità di crescita di *O. oeni*, pH ed etanolo.

2.3.9. Equazioni polinomiali per descrivere il rilascio di istamina, tiramina e putrescina da parte di *O. oeni* al variare di pH e etanolo.

I rilasci di istamina, tiramina e putrescina monitorati nel disegno sperimentale (paragrafo 2.3.7) sono stati elaborati insieme ai valori di pH e etanolo. Lo scopo era quello di ottenere equazioni polinomiali di secondo grado a tre variabili, con i relativi grafici di superficie (a tre dimensioni), capaci di descrivere le dinamiche di rilascio delle diverse AB da parte di *O. oeni* in funzione del pH e dell'etanolo. Per tale elaborazione sono state prese in considerazione le concentrazioni delle tre AB riscontrate al termine della fermentazione malolattica in fase stazionaria tardiva perché questo è il momento in cui solitamente, nella pratica di cantina, il vino dovrebbe essere trattato per eliminare la popolazione lattica.

I risultati ottenuti sono riportati nelle figure 2.56–2.58.

L'equazione polinomiale di secondo grado ottenuta per il rilascio dell'istamina al variare del pH e della concentrazione di etanolo è risultata la seguente:

$$\begin{aligned} \text{Istamina} = & 270,8867 + 4,0337 \cdot \text{EtOH} - \\ & 154,6963 \cdot \text{pH} + 0,3499 \cdot \text{EtOH}^2 - \\ & 3,5823 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{pH} + 27,7971 \cdot \text{pH}^2 \end{aligned}$$

Dal grafico riportato in figura 2.56 è possibile osservare come i rilasci di istamina più significativi sembra si siano realizzati quando il pH e l'etanolo erano a valori non troppo restrittivi per la crescita e la sopravvivenza di *O. oeni*. Infatti, a valori di pH alti (intorno a 4,0) ed etanolo bassi (vicino al 7%) la capacità di rilascio di istamina da parte della popolazione di *O. oeni* sembrava essere massima. Rilasci di istamina meno significativi si sono realizzati invece in presenza di condizioni di pH comprese tra 3,7–4,0 e di etanolo tra 12 e 14 %. Se le condizioni diventavano più

stringenti, e cioè pH inferiore a 3,3 ed etanolo maggiore del 14%, i rilasci di istamina diventavano più significativi.

Pertanto, è possibile concludere che vini con

- basso contenuto di etanolo e
- pH elevati

sono teoricamente i più esposti al rischio di formazione di **istamina** da parte di *O. oeni*.

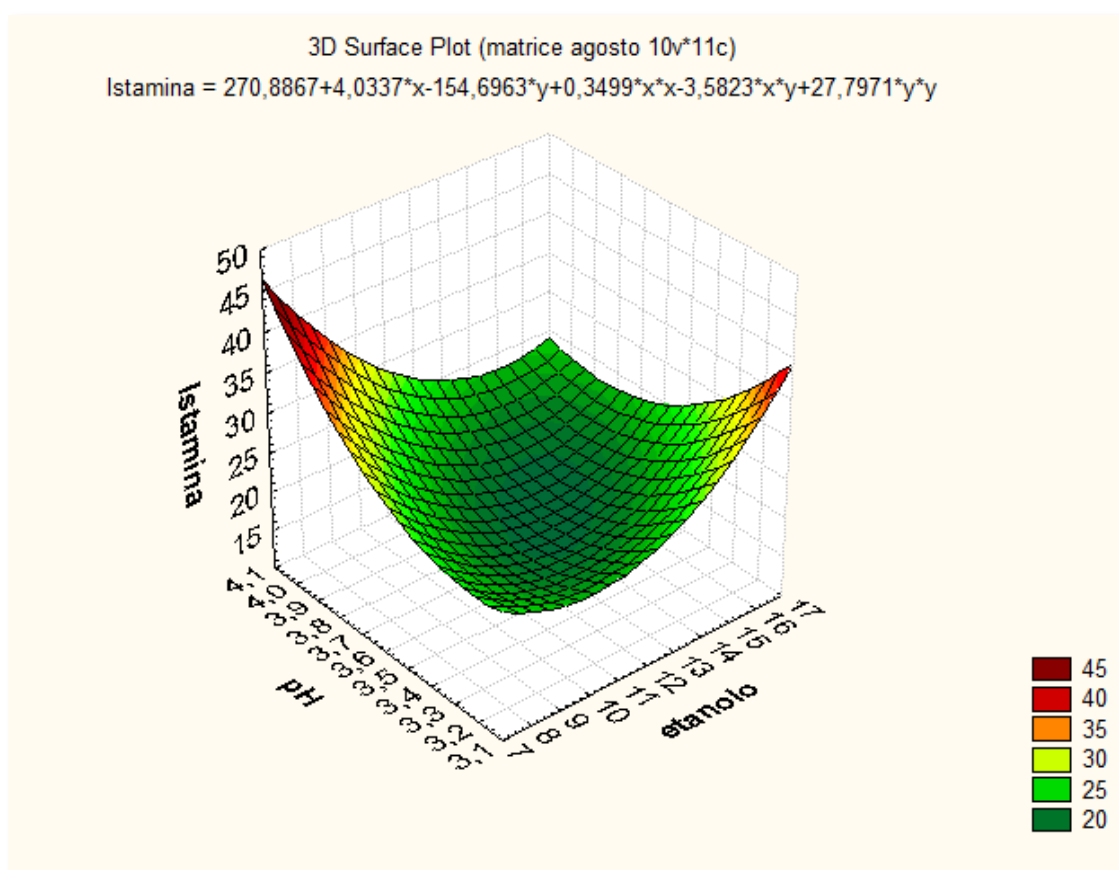
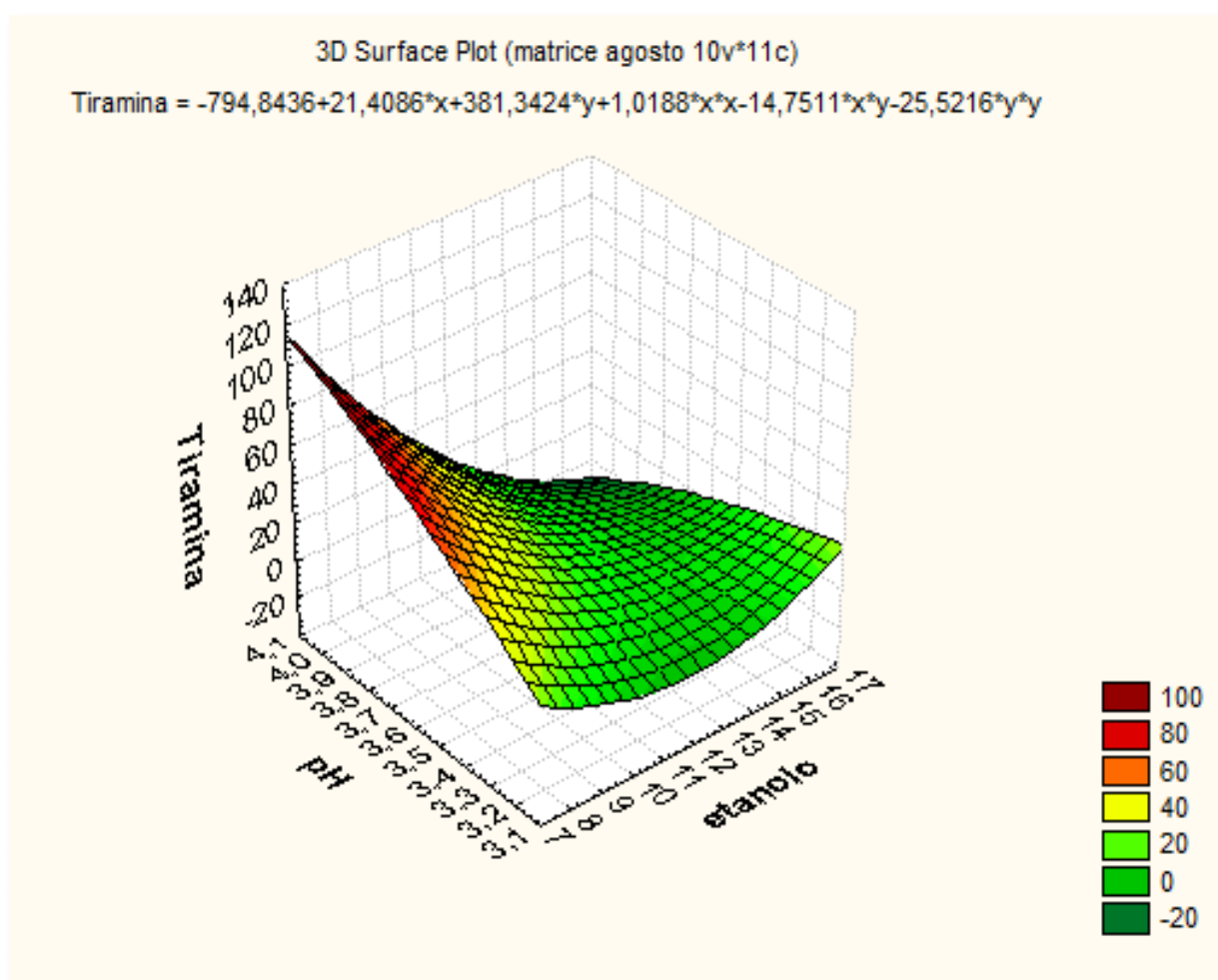


Figura 2.56. Rappresentazione grafica dell'equazione polinomiale di secondo grado che mette in relazione l'istamina prodotta da *O. oeni* con il pH e l'etanolo.

L'equazione polinomiale di secondo grado ottenuta per il rilascio di tiramina al variare del pH e della concentrazione di etanolo è risultata la seguente:

$$\text{Tiramina} = -794,8436 + 21,4086 \cdot \text{EtOH} + 381,3424 \cdot \text{pH} + 1,0188 \cdot \text{EtOH}^2 - 14,7511 \cdot \text{pH} \cdot \text{EtOH} - 25,5216 \cdot \text{pH}^2$$

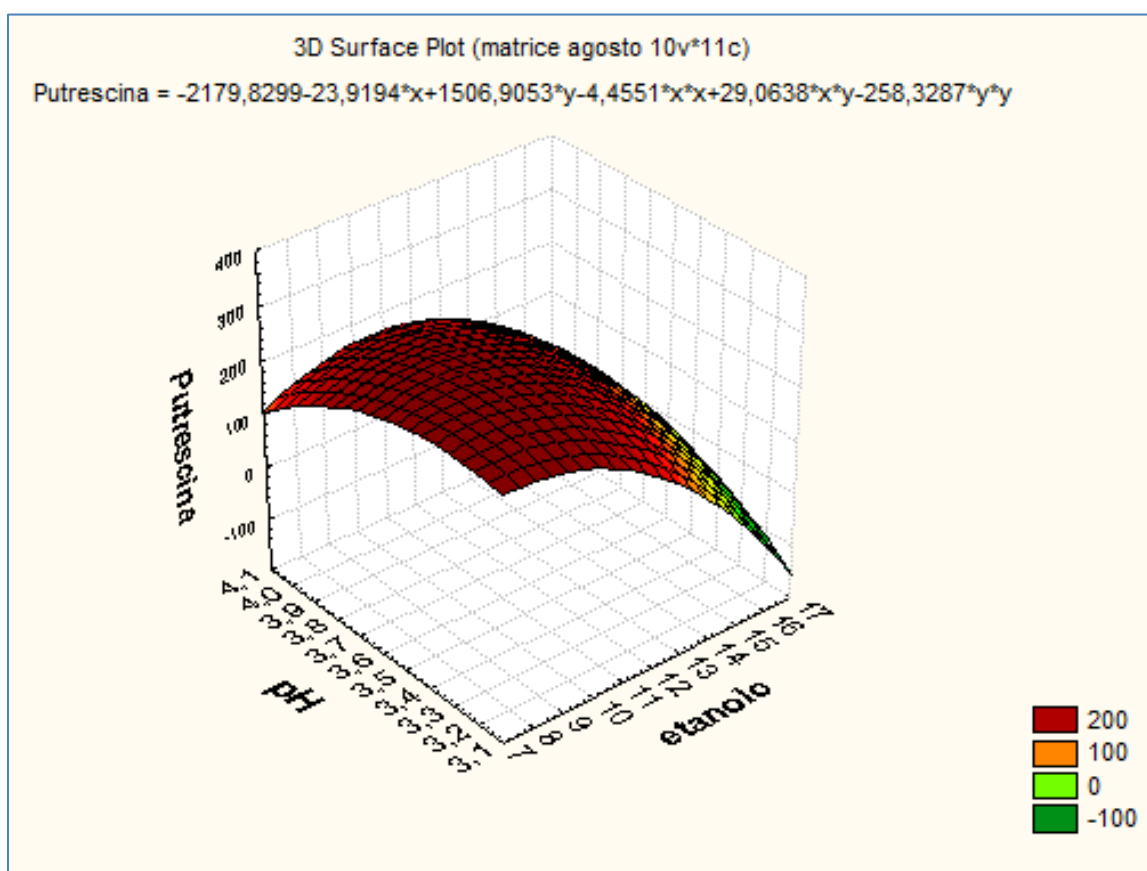


*Figura 2.57. Rappresentazione grafica dell'equazione polinomiale di secondo grado che mette in relazione la tiramina prodotta da *O. oeni* con il pH e l'etanolo.*

La produzione maggiore di **tiramina** è stata riscontrata con:

- valori di pH più elevati
- e di etanolo più bassi.

Concentrazioni di etanolo più elevate garantivano rilasci di tiramina minori, indipendentemente dal pH.



*Figura 2.58. Rappresentazione grafica dell'equazione polinomiale di secondo grado che mette in relazione la putrescina prodotta da *O. oeni* con il pH e l'etanolo.*

Infine, la stessa equazione calcolata per la putrescina:

$$\text{Putrescina} = -2179,8299 - 23,9194 * \text{EtOH} + 1506,9053 * \text{pH} - 4,4551 * \text{EtOH}^2 + 29,0638 * \text{EtOH} * \text{pH} - 258,3287 * \text{pH}^2$$

L'etanolo è risultato essere il parametro che influenza maggiormente il rilascio di putrescina. Infatti a concentrazioni più elevate di questa sostanza, indipendentemente dai valori di pH, i rilasci sono stati minori. Viceversa, concentrazioni basse di etanolo si sono dimostrate responsabili di accumuli elevati di questa AB.

Il pH non ha dimostrato di influenzare significativamente il rilascio di putrescina.

Le equazioni appena mostrate potrebbero essere utilizzate anche per prevedere il contenuto di AB in vino. Ciò potrebbe essere realizzato semplicemente inserendo nelle formule sopra riportate i valori di pH ed etanolo del vino su cui si desidera fare una previsione. Le diverse equazioni, infatti, forniranno le concentrazioni massime che le AB potranno raggiungere in quelle condizioni di pH ed etanolo, a patto che sia presente una popolazione di *O. oeni* capace di produrre AB. Le concentrazioni teoriche che si ricaveranno dall'elaborazione saranno quelle massime possibili poiché le equazioni sono state ricavate in sistemi in cui gli aminoacidi precursori non erano mai a concentrazioni limitanti. E' evidente che se l'aminoacido precursore risulterà presente in vino in concentrazioni inferiori rispetto a quelle potenzialmente utilizzabili dalla popolazione microbica, il contenuto dell'AB che se ne ricaverà nella pratica sarà minore di quello previsto.

Un'altra difficoltà che si può incontrare ad utilizzare le equazioni sopra riportate a scopo predittivo è dovuta al fatto che alcune volte il contenuto delle diverse AB nelle prove del disegno sperimentale non si stabilizza completamente, neppure durante la fase di morte di *O. oeni*. In altri casi sembra stabilizzarsi per un periodo per poi iniziare di nuovo a crescere. Pertanto, è difficile individuare le concentrazioni adeguate di AB da inserire nel modello previsionale. Tali concentrazioni, infatti, per rendere il modello efficace

dovrebbero essere rappresentative di quelle presenti in vino nel momento in cui la popolazione lattica viene eliminata per rendere il vino stabile, cosa questa difficile da realizzare.

2.3.10. Analisi delle componenti principali condotta sui dati ottenuti con il disegno sperimentale.

I dati ottenuti con il disegno sperimentale sono stati ulteriormente elaborati mediante l'analisi delle componenti principali per verificare se determinate condizioni di pH ed etanolo possono o meno portare a produzioni simili delle diverse AB.

I risultati dell'analisi delle componenti principali eseguita sui dati ottenuti in fase stazionaria precoce sono riportati in figura 2.59 che mostra come tutti i casi, le diverse prove del disegno sperimentale, si distribuiscano in due gruppi, ad eccezione della prova 4 che è anche quella con il contenuto di etanolo più elevato (16%v/v).

Il primo gruppo contiene le prove con un contenuto di etanolo compreso tra 8 e 10 gradi alcolici, mentre il secondo tra 10 e 14. Il primo gruppo riunisce le prove con velocità di crescita maggiori e rilasci più consistenti di quasi tutte le AB, soprattutto putrescina e tiramina.

La stessa indagine condotta sui dati ottenuti in fase stazionaria tardiva ha dato sostanzialmente gli stessi risultati (figura 2.60). E', infatti, possibile individuare tre gruppi sulla base del contenuto in alcol presente nelle diverse prove. In questo caso però il fattore 1 e 2 spiegavano circa il 67% della variabilità contro il 73% osservato prendendo in esame i dati in fase stazionaria precoce.

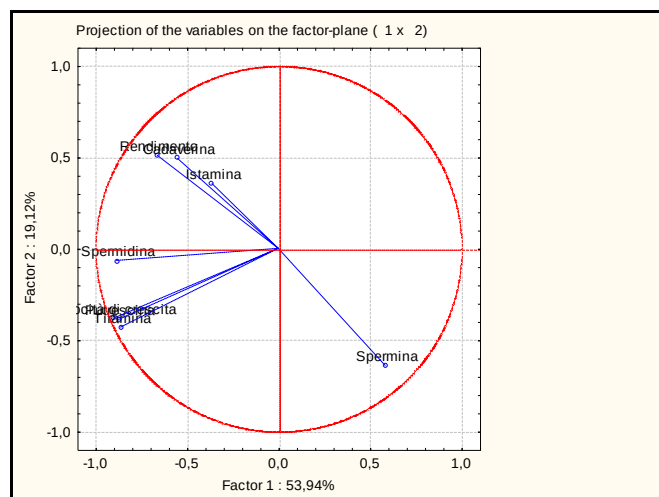
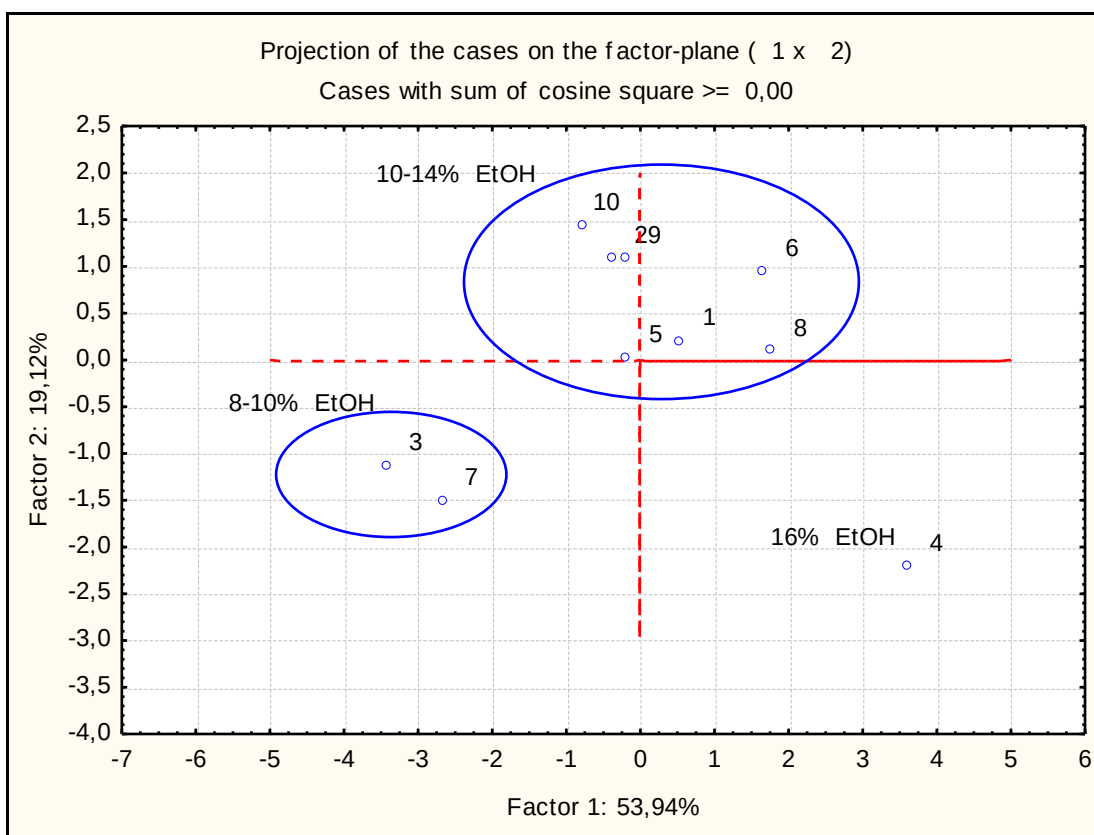


Figura 2.59. Analisi delle componenti principali eseguita sui dati ottenuti in fase stazionaria precoce.

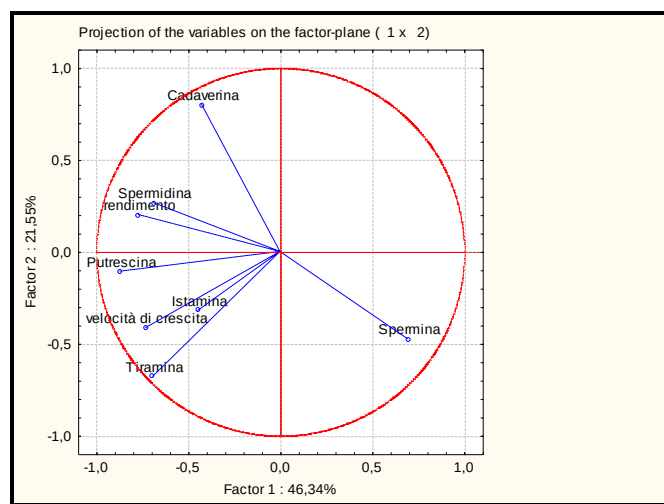
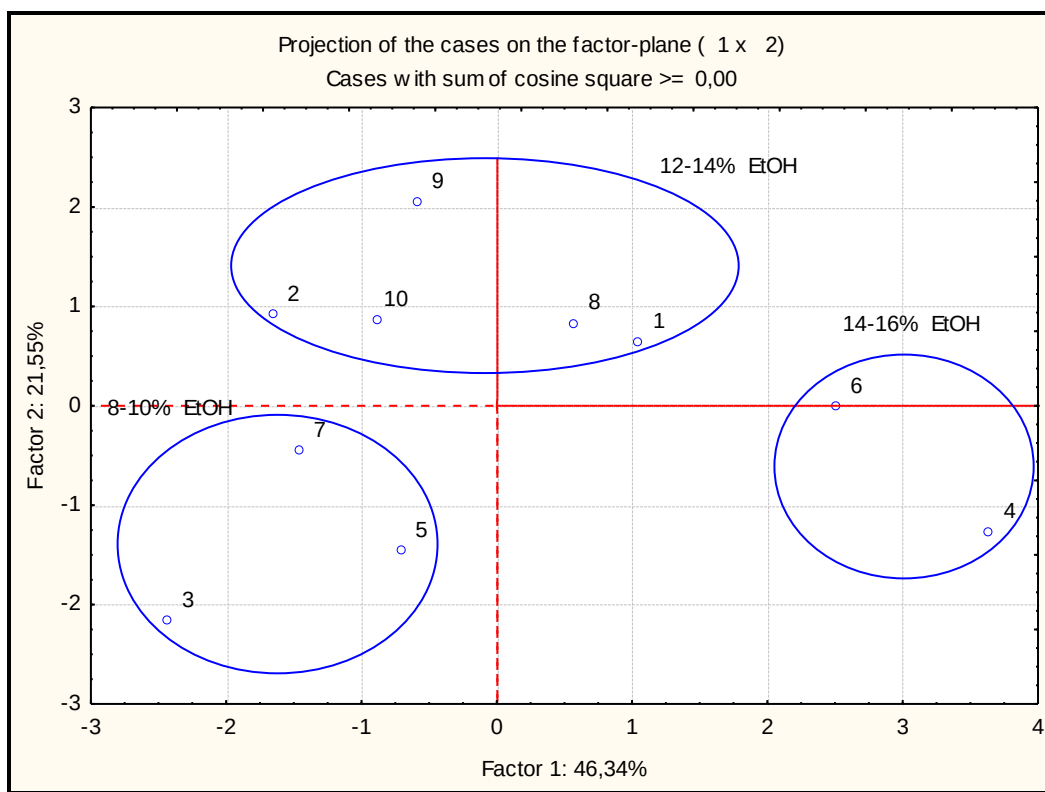
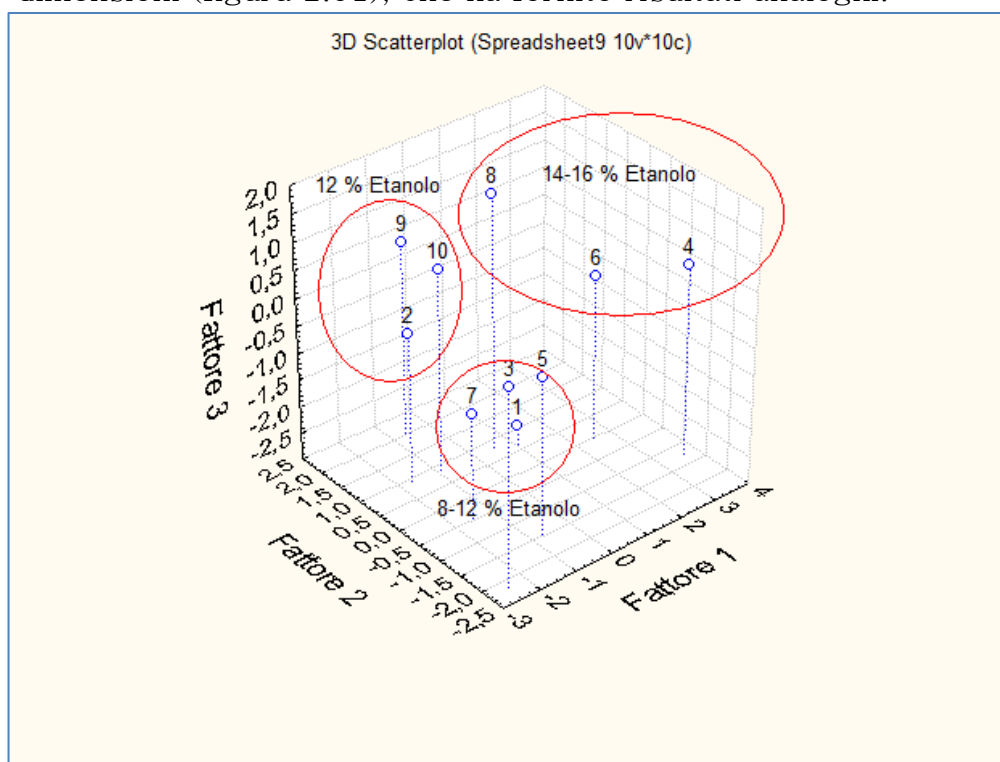


Figura 2.60: Analisi delle componenti principali eseguita sui dati ottenuti in fase stazionaria tardiva.

Per meglio verificare la correttezza dei raggruppamenti, sono stati riportati i primi tre fattori in un grafico a tre dimensioni (figura 2.61), che ha fornito risultati analoghi.



Coordinate fattoriali delle variabili, basate sulle correlazioni (fase stazionaria tardiva)								
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Factor 8
Velocità di crescita	-0,732350	-0,415760	-0,245616	0,393359	-0,233845	-0,141680	0,026802	-0,016546
Rendimento	-0,772338	0,201125	-0,417379	-0,354792	0,235609	-0,003979	0,083920	-0,019765
Putrescina	-0,870005	-0,107434	-0,296817	-0,135376	-0,227592	0,224562	-0,151200	0,005857
Cadaverina	-0,425856	0,799898	0,121434	-0,116495	-0,362855	-0,092246	0,101128	0,009650
Istamina	-0,446335	-0,320167	0,802238	-0,014792	-0,046097	0,198178	0,114018	-0,008591
Tiramina	-0,691336	-0,678436	0,003499	-0,167557	0,098175	-0,140842	0,059840	0,025201
Spermidina	-0,689744	0,265967	0,613011	-0,031244	0,138312	-0,171406	-0,167964	-0,005886
Spermina	0,694945	-0,475508	0,107278	-0,427834	-0,286526	-0,112078	-0,039756	-0,012446

Figura 2.61. Analisi delle componenti principali considerando i 3 fattori più significativi (1, 2 e 3) eseguita sui dati ottenuti in fase stazionaria tardiva.

Infine, l'elaborazione condotta sui dati durante la fase di morte ha confermato quanto osservato in fase stazionaria, ma con i primi due fattori che spiegavano oltre l'83% della variabilità (fig. 2.62)

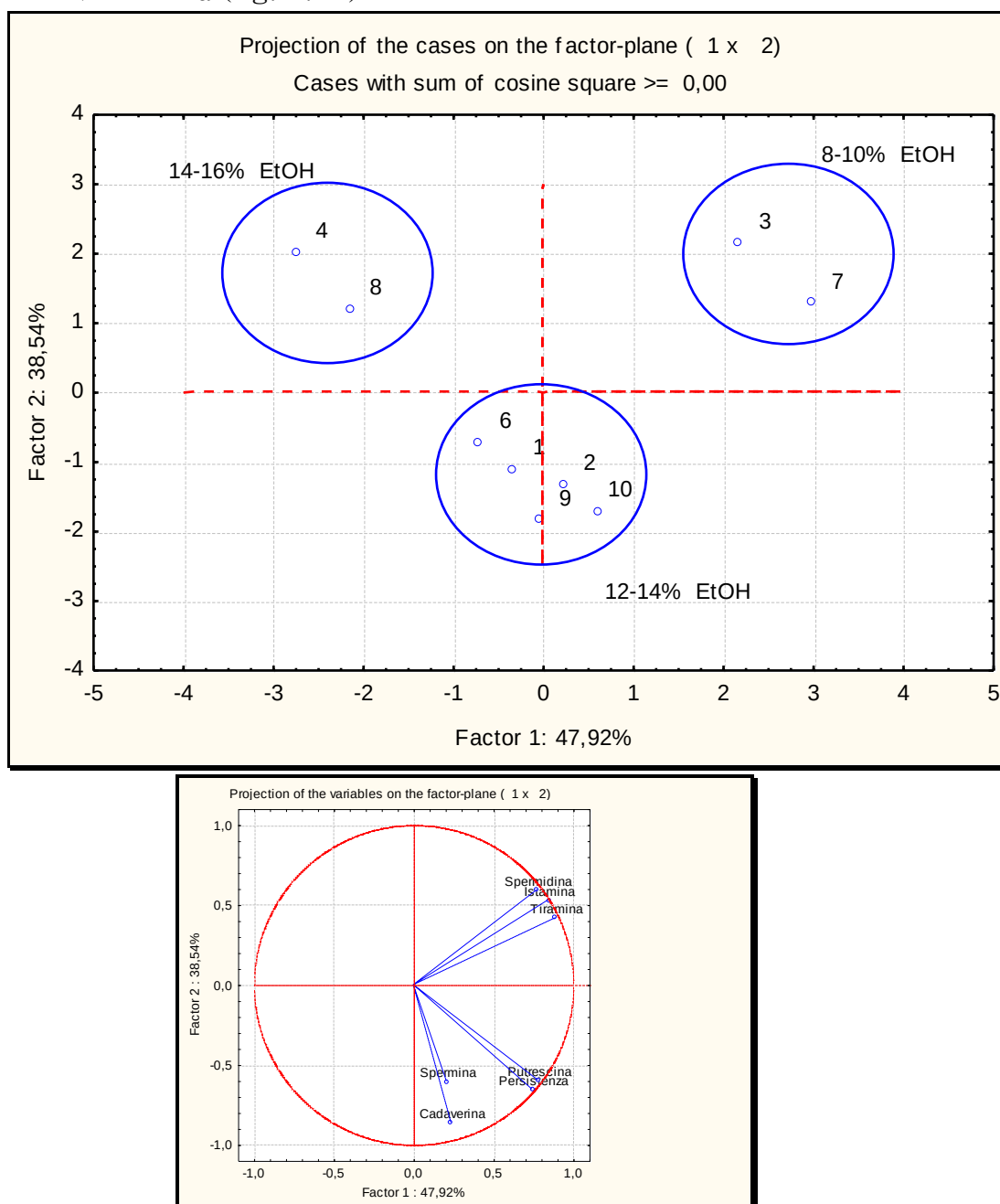


Figura 2.62.: Analisi delle componenti principali eseguita sui dati ottenuti in fase di morte.

2.3.11. Conclusioni III anno di attività: studio di fattori multipli sulla produzione di AB.

Come riportato da molti Autori, le condizioni necessarie e sufficienti perché si formino AB nel vino sono le seguenti,:

1. Presenza di una popolazione microbica capace di formare AB (solitamente *O. oeni* durante e dopo la fermentazione malolattica);
2. Presenza di aminoacidi precursori.

Una volta che si sono verificate queste due condizioni, la cinetica di rilascio e la quantità delle AB alla fine del processo produttivo del vino sarà funzione delle condizioni ambientali in cui il microrganismo si trova a operare. Pertanto, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare come alcuni fattori intrinseci siano in grado di influenzare il rilascio di AB in vino da parte di *O. oeni*. I risultati ottenuti possono essere così riassunti:

1. la disponibilità o meno di acido malico non influenza la capacità di *O. oeni* di formare AB;
2. l'influenza dei fattori nutrizionali sulla produzione di AB sembra secondaria rispetto a quella di fattori che possono influenzare lo stato fisiologico della cellula;
3. Nonostante si ritenga che il ruolo fisiologico della formazione di AB sia quello di incrementare il pH intracellulare, il pH extracellulare non sembra essere correlato con la produzione di queste sostanze in vino;
4. L'etanolo sembra influenzare direttamente lo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni* (velocità di crescita e rendimento di crescita) e di conseguenza il rilascio di AB: migliore è lo stato fisiologico delle cellule (basso grado alcolico, pH elevato) maggiore è il rilascio di AB.
5. Una maggior persistenza di *O. oeni* non sembra essere correlata con un maggior rilascio delle singole AB

2.3.12. Applicazione dei protocolli di PCR e di RT-PCR nel corso di FML su scala pilota

Nell'ultima fase del progetto era previsto l'applicazione dei protocolli di PCR, precedentemente sviluppati, per il monitoraggio di fermentazioni malolattiche (FML) su scala pilota. Pertanto, durante lo svolgimento della FML presso la Cantina sperimentale del Consorzio Tuscania, sono stati prelevati dei campioni di vino che sono stati sottoposti ad analisi in Real-Time PCR per la determinazione quantitativa della popolazione totale di *O. oeni*, dato che la FML era stata indotta mediante inoculo di ceppi commerciali.

Inoltre, nella stessa cantina, tank da 25L sono stati inoculati in triplo (prove A, B e C) con tre ceppi di batteri malolattici appartenenti alla collezione del DiBA. I ceppi scelti provenivano da vini diversi (CH23/4: Chianti, BM17/93: Brunello di Montalcino, CD3/3: Chardonnay) che avevano portato a termine la FML in modo spontaneo, senza problemi, in tempi ragionevoli e senza formazione di AB. Prima dell'impiego di questi ceppi nella sperimentazione è stata comunque verificata sia la loro incapacità a produrre AB in mezzo sintetico (analisi HPLC dei surnatanti), sia l'assenza dei geni *odc* e *hdc* (PCR end-point). Per ottenere la biomassa necessaria all'inoculo in vino, ciascun ceppo è stato coltivato separatamente secondo lo schema riportato in figura 2.63 in modo tale che nella fase finale il volume totale di coltura fosse di ca 7,5 litri. Questa quantità di coltura è stata centrifugata a 5000xg per 20 minuti a 4°C e la biomassa è stata raccolta ed utilizzata per inoculare 75 litri di vino suddivisi in tre diversi tank. Le cellule per l'inoculo in vino sono state prelevate al sesto giorni di crescita e quindi in fase di crescita stazionaria (figura 2.64), quando cioè *O. oeni* è maggiormente capace di resistere allo shock da etanolo (Granchi *et al.*, 1996). L'inoculo è stato eseguito in modo tale da ottenere una concentrazione iniziale di cellule in vino di circa 10^8 UFCmL⁻¹ in ciascun tank.

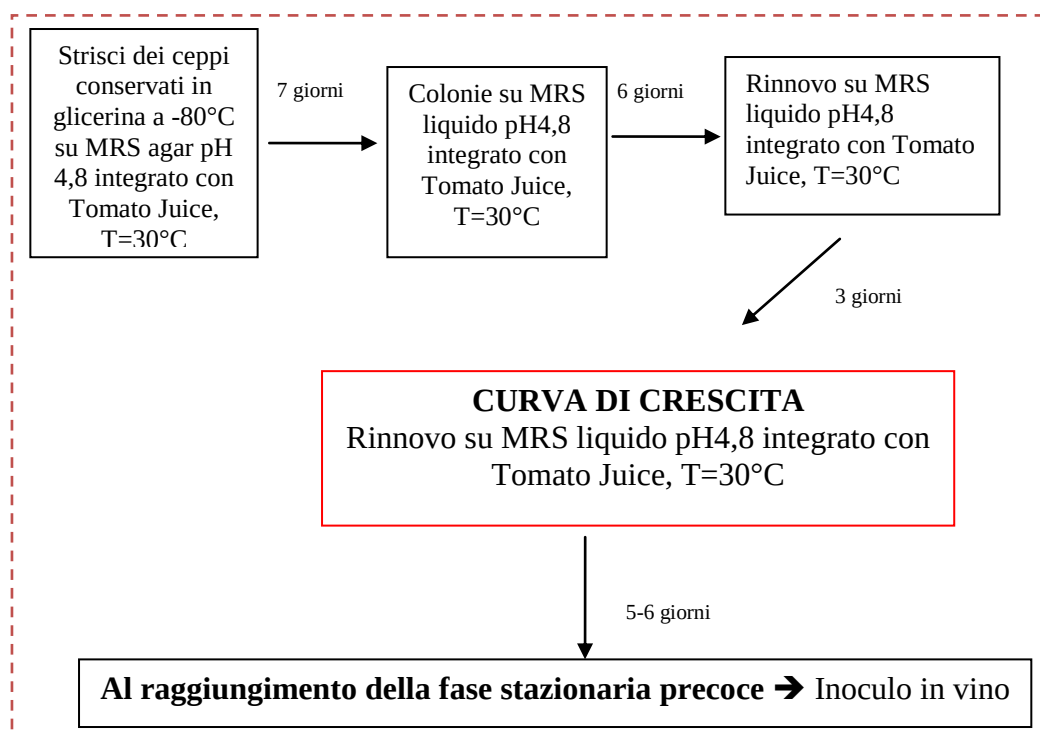


Figura 2.63. Schema per la preparazione dell'inoculo in vino dei batteri malolattici

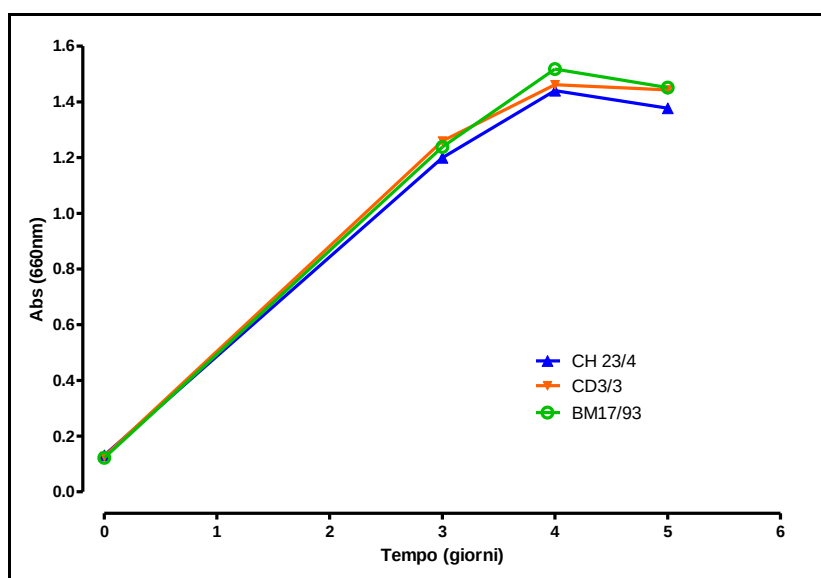


Figura 2.64 Curve di crescita in mezzo sintetico dei tre ceppi di O. oeni inoculati in vino per indurre la fermentazione malolattica

La composizione chimica e microbiologica del vino utilizzato nella sperimentazione è riportata in tabella 2.23.

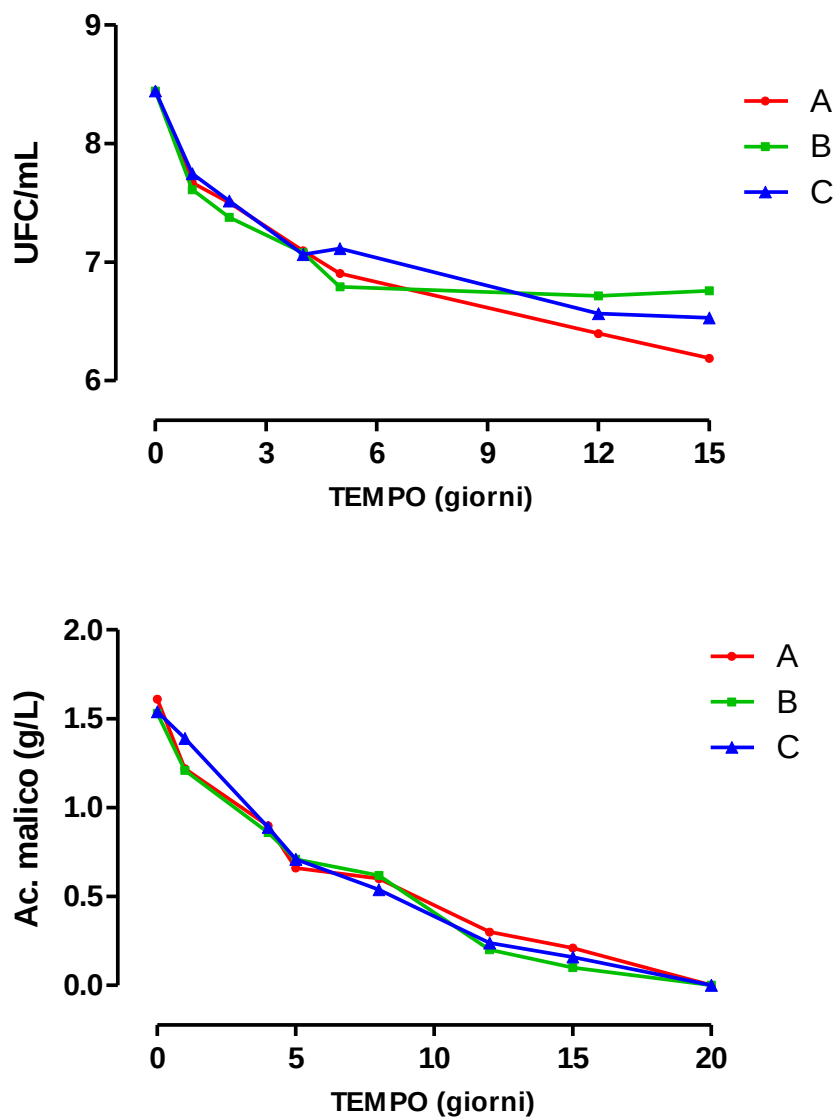
Tabella 2.23. *Caratteristiche chimiche e microbiologiche del vino prima dell'inoculo dei batteri malolattici*

Parametro	Valori
Etanolo (% v/v)	12,45
Zuccheri (gL ⁻¹)	1
Acidità totale (gL ⁻¹)	6,55
Acidità volatile (gL ⁻¹)	0,30
Solforosa (mgL ⁻¹)	40
Acido malico (gL ⁻¹)	1,55
Batteri acetici (UFCmL ⁻¹)	90
<i>O. oeni</i> (UFCmL ⁻¹)	18

Conte vitali delle cellule sono state eseguite anche con il metodo classico di semina su piastra al momento dell'inoculo e durante lo svolgimento della FML. Parallelamente è stata determinata la concentrazione dell'acido L-malico mediante metodo enzimatico.

I dati ottenuti sono mostrati nella figura 2.65 che riporta l'andamento sia della popolazione vitale di *O. oeni* che della degradazione dell'acido malico. Dall'analisi dei risultati si evidenzia che nonostante le cellule batteriche, una volta inoculate in vino, vadano incontro ad una fase di morte, al quinto giorno si stabilizzano raggiungendo un valore dell'ordine di 10⁶ UFCmL⁻¹. A questo andamento della popolazione vitale corrisponde una analoga cinetica di degradazione dell'acido malico che, dopo circa 5 giorni ha presentato una diminuzione del 53% circa.

Dopo un periodo di 15-20 giorni, la FML è stata completata, dimostrando l'efficacia dell'inoculo.



*Figura 2.65 Andamento della popolazione vitale di *O. oeni* dopo inoculo in vino (sopra) e degradazione dell'acido malico (sotto) in tre tank A, B e C*

Durante lo svolgimento della FML, come detto in precedenza, campioni di vino prelevati da diversi tank inoculati con ceppi di *O. oeni* sono stati analizzati mediante il protocollo di Real-Time PCR, messo a punto nel corso del secondo anno di attività, che prevedeva la determinazione quantitativa della popolazione batterica totale.

Il DNA, è stato estratto direttamente dai campioni di vino tramite il kit Nucleo Spin® Food (Macherey-Nagel) dopo trattamento con polivinilpirrolidone (PVP). Per le reazioni di amplificazione è stato impiegato lo strumento Bio-Rad CFX96 e, come sistema di rilevamento degli ampliconi, è stato utilizzato l'EvaGreen®. Ciascuna reazione è stata condotta in un volume finale di 20 µL contenente 8 µL di campione, 10 µL di 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad), 0,60 µL per ciascuno dei due *primer* (300 nM ciascuno) e 0,8 µL di acqua ultrapura, secondo il seguente programma:

- denaturazione a 95°C per 10 minuti
- 95°C per 30 s e 60°C per 1 minuto per 45 cicli

Al termine della reazione è stata effettuata l'analisi della curva di melting per verificare che il prodotto amplificato fosse il DNA bersaglio e che fossero assenti prodotti aspecifici. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante il software CFX Biorad versione 1.5. La temperatura di melting, la baseline e il ciclo soglia (Treshold Cycle = Ct) sono stati calcolati e determinati automaticamente dal software. Le cinetiche di amplificazione e le relative curve di melting ottenute per campioni di DNA analizzati sono riportate, rispettivamente nelle figure 2.66 e 2.67.

Dall'analisi delle curve di melting è stata evidenziata la specificità del prodotto di amplificazione dato che i picchi di fluorescenza relativi ai campioni e alle soluzioni standard di DNA sono in corrispondenza di uno stesso valore di temperatura.

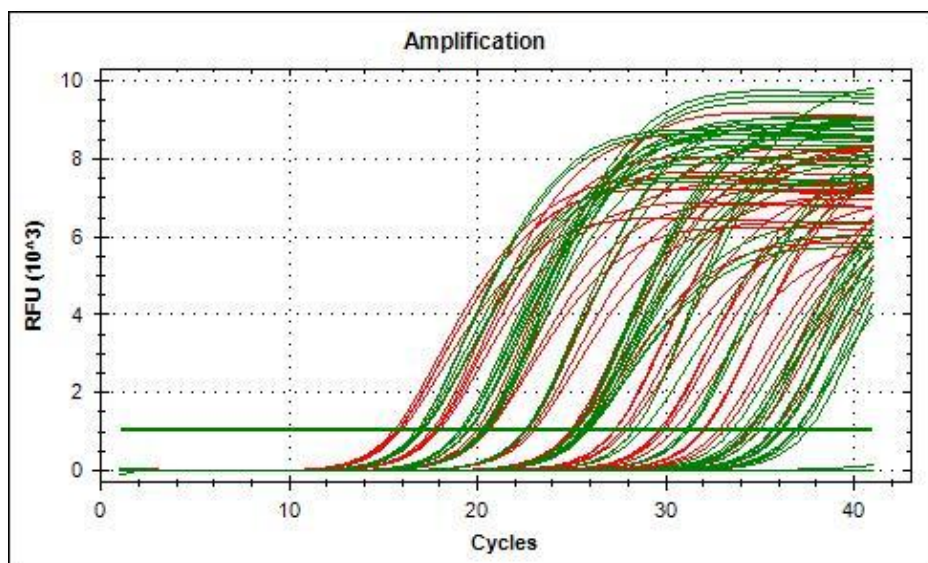


Figura 2.66. Cinetiche delle reazioni di amplificazione in Real-time PCR ottenute analizzando campioni di DNA estratto da campioni di vino I dati sono riportati in triplicato (linee verdi = campioni; linee rosse = soluzioni di DNA standard)

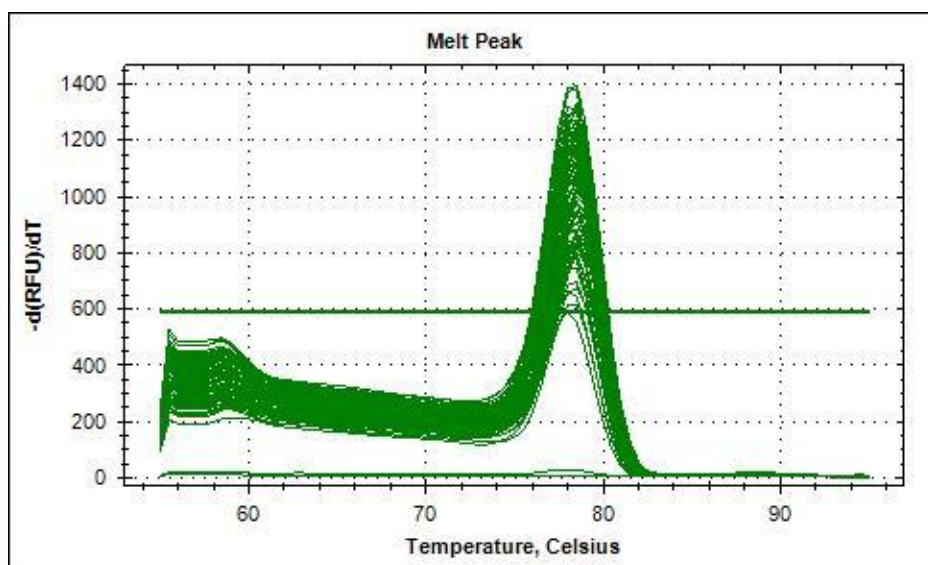


Figura 2.67. Curve di melting relative alle reazioni di amplificazione in Real-time PCR le cui cinetiche sono mostrate in figura 2.66.

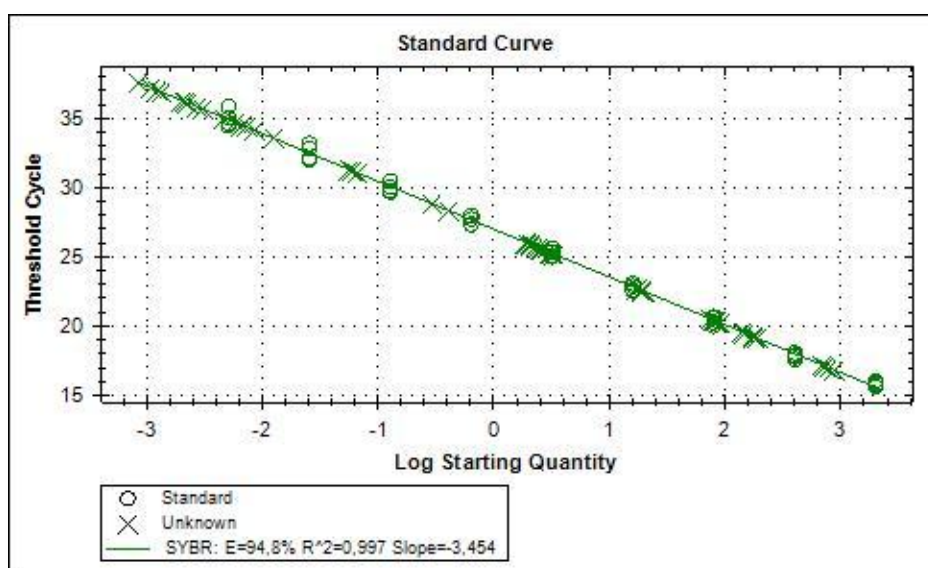


Figura 2.68 Valore dei cicli soglia (x) ottenuti mediante il protocollo di Real-Time PCR per i campioni di vino in relazione alla concentrazione di DNA e alla curva standard (O).

Nella figura 2.68 vengono mostrati i risultati della quantificazione del DNA estratto dai campioni di vino in relazione alla curva standard. Tali risultati riportati nella tabella 2.24 sono stati correlati con quelli derivanti dal metodo classico di conta vitale su piastra, ottenendo la retta riportata nella figura 2.69. Dal confronto dei dati ottenuti con le due tecniche non è emersa una correlazione molto elevata ($R^2=0,673$), tuttavia il protocollo deve essere applicato ad un maggiore numero di campioni prima di poter trarre delle conclusioni definitive. In effetti, le differenze riscontrate tra le due tecniche sembrano casuali e sono molto probabilmente da attribuire ad un problema di efficienza di estrazione del DNA dal vino.

In ogni caso, dall'analisi dei dati mostrati in tabella 2.24, emergono differenze quantitative della popolazione di *O.oeni* che non sono molto significative dal punto di vista enologico.

Tabella 2.24. Determinazione quantitativa della popolazione di *O. oeni* presente in 12 campioni di vino in fermentazione malolattica mediante Real-Time PCR e la tecnica di conta su piastra

Campioni di vino	RT-PCR (cellule mL ⁻¹)	Conta su piastra (UFCmL ⁻¹)
1	6,4 x 10 ⁷	2,8 x 10 ⁷
2	1,1 x 10 ⁸	6,0 x 10 ⁷
3	6,4 x 10 ⁷	5,9 x 10 ⁶
4	1,4 x 10 ⁷	5,1 x 10 ⁶
5	1,8 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶
6	1,8 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶
7	1,5 x 10 ⁶	3,7 x 10 ⁶
8	5,6 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶
9	2,8 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁶
10	6,7 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁶
11	6,4 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵
12	1,1 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶

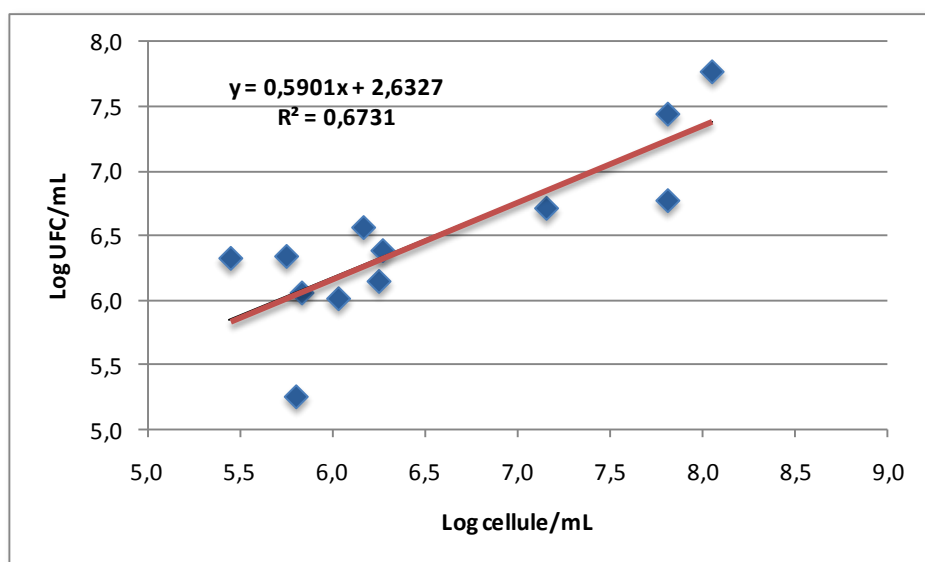


Figura 2.69. Relazione lineare tra il numero di cellule di *O.oeni* per millilitro determinato mediante Real-Time PCR e i valori di UFC mL⁻¹ ottenuti mediante conta su piastra per 12 campioni di vino analizzati

Capitolo 3. Conclusioni

La presente ricerca, finalizzata al controllo della fermentazione malolattica (FML) per la tutela della qualità del vino, si è incentrata sul problema della produzione delle ammine biogene (AB) da parte dei batteri lattici dal momento che tali sostanze per la loro tossicità possono determinare effetti negativi sulla salute del consumatore.

L'approccio utilizzato ha riguardato principalmente due aspetti: da una lato si è cercato di mettere a punto strumenti diagnostici rapidi per il monitoraggio delle popolazioni batteriche capaci di produrre ammine biogene in vino, e dall'altro, di determinare le condizioni che durante il processo di vinificazione possono favorire la formazione delle AB. I risultati conseguiti hanno consentito di raggiungere i seguenti due obiettivi principali:

1. Metodi rapidi per individuare e monitorare *O. oeni*, la specie principalmente responsabile della FML, sia come popolazione totale che come ceppi capaci di produrre istamina e putrescina, (due AB importanti, in quanto la prima è ritenuta la più tossica e la seconda perché è quella più abbondante in vino)
2. Individuazione dei fattori intrinseci in grado di influenzare il rilascio di AB in vino da parte di popolazioni di ceppi di *O. oeni* capaci di produrre queste sostanze.

Per quanto riguarda il primo obiettivo, sono state messe a punto una serie di reazioni PCR (End Point e Real Time) che si sono dimostrate utili strumenti per un rapido monitoraggio della fermentazione malolattica. In particolare, sono state messe a punto sia una serie di reazioni di multiplex PCR End Point per individuare ceppi di *O. oeni* produttori di istamina e putrescina, sia reazioni di Real Time PCR capaci di quantificare in vino nel giro di 24 ore (contro i 7-10 giorni dei metodi microbiologici classici) non solo la popolazione totale di *O. oeni*, ma anche quella capace di

produrre istamina e/o putrescina. Tutte le reazioni di Real Time PCR messe a punto hanno dimostrato un'efficienza molto elevata (range 92-101%). Andando però a confrontare i risultati ottenuti con la Real Time rispetto a quelli ottenuti con la conta vitale in piastra, si sono ottenuti risultati non sempre in linea. Infatti, quando la popolazione di *O. oeni* era quantificata in un mezzo di coltura o in vino sterile artificialmente inoculato, la correlazione che si ricavava dai dati ottenuti con le due tecniche era ottimale ($R^2=0,983$ e $R^2=0,977$ rispettivamente). Viceversa, quando la quantificazione veniva eseguita in campioni reali di vino, la correlazione diminuiva ($R^2=0,673$). Considerando l'efficienza delle reazioni messe a punto è ipotizzabile che la fase critica della metodica Real Time sia da individuarsi nell'estrazione del DNA da vino, pertanto successivi studi saranno necessari in tal senso per migliorare tale protocollo. La metodica comunque sembra offrire prospettive applicative assai promettenti.

Infine, per quanto riguarda il secondo obiettivo, i risultati ottenuti dalla sperimentazione hanno dimostrato come lo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni* sia il fattore che influenza maggiormente la produzione di AB in vino. In particolare, migliore è lo stato fisiologico della popolazione di *O. oeni*, maggiore sarà il rilascio di AB e tale rilascio sarà direttamente proporzionale alla disponibilità di aminoacido precursore, indipendentemente dalla presenza o meno di acido malico. Pertanto, se in un vino è presente una popolazione di *O. oeni* che possiede il corredo genetico necessario per produrre AB, tali sostanze saranno prodotte in concentrazioni più significative se la popolazione microbica si troverà in condizioni fisiologiche meno restrittive per la crescita e la sopravvivenza e cioè in presenza di valori di pH non eccessivamente bassi e a concentrazioni di etanolo non eccessivamente alte. Pertanto, vini con bassi tenori alcolici sono potenzialmente più esposti al problema della formazione di AB.

Bibliografia

1. Araque M.I., Bordons A., Reguant C. (2008). A multiplex PCR method for simultaneous species identification and strain typification of *Oenococcus oeni*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 15–18.
2. Arbeli Z.; Fuentes C.L. (2007). Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiology Letters*, 272 (2), 269–275.
3. Bover-Cid S., Holzapfel W.H., (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 53, 33–41.
4. Chang S.-C., Lin C.-W., Jiang C.-M., Chen H.-C., Shih M.-K., Chen Y.-Y., Tsai Y.-H. (2009). Histamine production by bacilli bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from fruit wines. *LWT Food Science and Technology* 42, 280–285.
5. Coton E., Coton M., (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of gram positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 296–304.
6. Dicks L.M.T., Dellaglio F., Collins M.D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen.nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45, 395–397.
7. Granchi L., De Philippis R. Vincenzini M. (1996). Capacità malolattica di ceppi di *Leuconostoc oenos* selezionati per uso enologico. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 46, 273–283.
8. Granchi L. Talini D., Rigacci S., Guerrini S., Berti A., Vincenzini M. (2005a). Detection of putrescine-producer *Oenococcus oeni* strains by PCR. Book of Abstracts 8th symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, NL, August 28–1 september, 2005, C030.

9. Granchi L., Guerrini S., Vincenzini M. (2005b). I batteri lattici e la fermentazione malolattica. In “Microbiologia del Vino”, Vincenzini M., Romano P., Farris G.A., Casa Editrice Ambrosiana, 261–288.
10. Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M. (2002). Biogenic ammine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.*, 44, 374–378.
11. Jara C., Mateo E., Guillamón J.M., Torija M.J., Mas A. (2008). Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 128(2), 336–341.
12. Landete J.M., Ferrer S., Pardo I. (2005a). Which are the lactic acid bacteria responsible for histamine production in wine? *Journal of Applied Microbiology*, 99, 580–586.
13. Landete, J.M., Ferrer, S., Polo L., Pardo I. (2005b). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1119–1124.
14. Landete J.M., de La Rivas B., Marcobal A., Muñoz R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic ammine-producing bacteria on foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 258–269.
15. Lawson A.J., Linton D., Stanley J., Owen R.J. (1997). Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture technique. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 375–380.
16. Lonvaud-Funel A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 317–331.
17. Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria., *FEMS Microbiol. Rev.* 199, 9–13.
18. Lucas P.M., Claisse O., Lonvaud-Funel A. (2008). High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine

- decraboxylase production phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 811–817.
19. Mangani S., Galli C., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. (2006). Sviluppo delle popolazioni microbiche ed accumulo di ammine biogene in vinificazione. *Vignevini*, 6, 79–83.
 20. Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. (2005). Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Current Microbiol.*, 51, 6–10.
 21. 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.
 22. Marcobal A., de las Rivas B., Moreno-Arribas M.V., Muñoz R. (2005). Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *Journal of Food Protection*, 68, 874–878.
 23. Marcobal A., Polo M. C., Martín-Álvarez P. J., Polo M. C., Muñoz R., Moreno-Arribas, M.V. (2006). Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*, 69, 397–404.
 24. Nannelli F., Claisse O., Gindreau E., de Revel G., Lonvaud-Funel A., Lucas P.M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 549–599.
 25. Orlando C., Pinzani P., Pazzagli M. (1998). Development in quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 36, 255–269.
 26. Pérez-Serradilla J.A., Luque de Castro M.D. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food Chemistry*, 111, 447–456.
 27. 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.
28. Rosi I., Nannelli F., Giovani G. (2009). Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Science and Technology*, 42(2), 525–530.
29. Sakar G., Kapelner S., Sommer S.S. (1990). Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.*, 18, 7465.
30. Silla Santos M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 29, 213–231.
31. Soufleros E., Bouloumpasi E., Zotou A., Loukou Z. (2007). Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry*, 101, 704–716.
32. Vincenzini M., Guerrini S., Mangani S., Granchi L. (2009). Amino Acid Metabolisms and Production of Biogenic Amines and Ethyl Carbamate. Chapter 9, in "Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine", H. König *et al.*, (Eds.), Springer-Verlag, 167–180.
33. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697–703.
34. Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 243–246.