

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

Dipartimento Agricoltura Ambiente e Alimenti



**“ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE
TECNOLOGICA DI *Lactobacillus plantarum* DA VINI ROSSI
TRADIZIONALI DELL’ITALIA MERIDIONALE”**

TESI PRESENTATA PER IL CONSEGUIMENTO DEL
***DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI
XXVI CICLO SSD AGR/16***

**Dottorando
Bruno Testa Matricola 143398**

Tutor: Prof. Massimo Iorizzo

Coordinatore Prof. Emanuele Marconi

Co-tutor

Prof.ssa: M. Victoria Moreno Arribas

CAPITOLO 1	3
IL VINO	3
CAPITOLO 2	8
I BATTERI LATTICI	8
2.1 Definizione e generalità	8
2.2 Evoluzione dei batteri lattici durante la vinificazione	9
2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> nel vino	11
2.4 Alterazioni nel vino dovuto allo sviluppo di batteri lattici	13
2.5 Criteri di selezione di batteri lattici di interesse enologico	15
CAPITOLO 3	16
LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA	16
3.1 Fattori che influenzano la fermentazione malolattica	18
3.2 Tecnologie di vinificazioni favorevoli e/o sfavorevoli alla fermentazione malolattica.....	20
3.3 Colture starter per fermentazione malolattica.....	20
3.4 Strategie di inoculo di colture starter per fermentazione malolattica.	21
CAPITOLO 4	23
INFLUENZA DEI BATTERI LATTICI SUL PROFILO SENSORIALE DEI VINI	23
4.1 Le sostanze polifenoliche nel vino e loro effetto sullo sviluppo dei batteri lattici	24
CAPITOLO 5	26
LE AMMINE BIOGENE.....	26
5.1 Le Ammine biogene negli alimenti.....	27
5.2 Tossicità delle ammine biogene.....	30
5.3 Microrganismi produttori di ammine biogene	31
5.4 Limiti di legge.....	32
CAPITOLO 6.....	33
CARATTERIZZAZIONE DEI BATTERI LATTICI	33
6.1 Caratterizzazione fenotipica.....	34
6.2 Caratterizzazione biomolecolare.....	34
6.2.1 16S-Amplified Ribosomal DNA RestrictionAnalysis (16S-ARDRA)	35
6.2.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	36
6.2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)	36
6.2.4 rep-PCR (Repetitive PCR)	37
6.2.5 RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA)	38
6.2.6 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	39
6.2.7 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	40
6.3 MALDI TOF/TOF	40
CAPITOLO 7	43
SCOPO DELLA TESI	43
CAPITOLO 8.....	44
MATERIALI E METODI.....	44
8.1 CAMPIONAMENTO	44
8.2 ANALISI CHIMICO-FISICHE	45
8.2.1 Determinazione del pH.....	45
8.2.2 Determinazione dell'acidità totale.....	45
8.2.3 Determinazione del grado alcolico.....	45
8.2.4 Determinazione dell'acido L-malico.....	45
8.2.5 Determinazione dell'acido L-lattico.....	46
8.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE	46
8.4 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA	47
8.4.1 Osservazione al microscopio ottico.....	47

8.4.2	Colorazione di Gram	47
8.4.3	Saggio della catalasi	47
8.4.4	Studio del profilo assimilativo delle fonti di carbonio	47
8.5	IDENTIFICAZIONE GENETICA	48
8.5.1	Analisi PCR-DGGE	48
8.5.2	Estrazione ed amplificazione del DNA batterico	48
8.5.3	Analisi DGGE	49
8.6	IDENTIFICAZIONE CON TECNICHE STRUMENTALI.....	51
8.6.1	MALDI TOF/TOF.....	51
8.7	BIOTIPIZZAZIONE DEI BATTERI	52
8.7.1	Analisi RAPD-PCR.....	52
8.8	CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA	54
8.8.1	Capacità di crescita di <i>L. plantarum</i> in Synthetic Wine.....	55
8.8.2	Produzione di batteriocine.....	57
8.8.3	Produzione di ammine biogene	58
8.8.4	Effetti di malvin-3,5-diglucoside sulla crescita di <i>L. plantarum</i>	61
8.8.4	Analisi dell'attività glucosidasica	62
8.8.4.1	Capacità dei ceppi di <i>L. plantarum</i> nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico commerciale (n-octylglucoside).....	62
8.8.4.2	Capacità dei ceppi di <i>L. plantarum</i> nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico estratto da uva	63
	CAPITOLO 9.....	65
	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	65
9.1	Risultati analisi chimico-fisiche dei vini.....	65
9.2	Risultati isolamento ed identificazione dei batteri	66
9.3	Caratterizzazione fenotipica.....	67
9.4	Identificazione genetica	69
	RISULTATI CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA	74
9.5	Crescita di <i>L. plantarum</i> in Synthetic Wine.....	74
9.6	Metabolismo dell'acido malico.....	79
9.7	MALDI TOF/TOF	80
9.8	Produzione di batteriocine	81
9.9	Produzione di ammine biogene.....	82
9.10	Effetti di malvin-3,5-diglucoside sulla crescita dei ceppi di <i>L. plantarum</i>	86
9.11	Analisi dell'attività glucosidasica	89
9.11.1	Capacità dei ceppi di <i>L. plantarum</i> nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico commerciale (n-octylglucoside).....	89
9.11.2	Capacità dei ceppi di <i>L. plantarum</i> nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico estratto da uva	91
	CONCLUSIONI.....	93
	BIBLIOGRAFIA	94

STATO DELL'ARTE

CAPITOLO 1

IL VINO

“Il vino è il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione alcolica, totale o parziale, di uve fresche, pigiate o non, o di mosti d’uva”.

Si tratta di una bevanda alcolica tipicamente mediterranea per origine e tradizione, la cui materia prima è costituita dalle bacche di *Vitis vinifera*, vale a dire dalla vite europea. La specie *V. vinifera* comprende un grandissimo numero di varietà (cultivar) con bacche bianche o con bacche nere (uve bianche e uve nere) alle quali corrisponde un altrettanto numero di vini.

Il vino è una bevanda costituita da circa 300 componenti organici ed inorganici, alcuni dei quali, già presenti nel mosto, si conservano anche nel vino (componenti dirette) ed altre di neoformazione, che prendono origine dal processo fermentativo e dalle reazioni secondarie ad esso legate (componenti indirette).

Fra i composti preesistenti nel mosto e che si trovano nel vino alcuni subiscono, nel corso della fermentazione alcolica, una diminuzione, altri rimangono invariati ed altri ancora possono subire un incremento, soprattutto, quando la fermentazione avviene in presenza delle parti solide dell’uva.

I composti di neoformazione, invece, derivano per la maggior parte dagli zuccheri e in minima parte dai composti azotati.

Tra le componenti dirette troviamo, l’acqua che rappresenta ca. l’85-90 % del totale, gli acidi organici, i composti fenolici, gli zuccheri, le sostanze minerali, le sostanze pectiche e le sostanze azotate.

Tra gli acidi organici del vino, che sono presenti anche nel mosto abbiamo:

l’**acido tartarico**, che nel vino rappresenta circa 1/3-1/4 degli acidi totali del vino inoltre è l’acido più forte tra quelli presenti nel vino. Questo acido risulta salificato con i cationi presenti (potassio e calcio), e nel passaggio da mosto a vino, la sua concentrazione può diminuire a causa della sua precipitazione come bitartrato di potassio, e tartrato neutro di calcio.

Tale andamento è provocato dall’aumento della concentrazione di alcol, e dall’abbassamento della temperatura nelle cantine, nel primo periodo di conservazione del vino.

L’**acido malico** è presente in quantità variabili da 1 a 8 g/L, a seconda delle condizioni pedoclimatiche, dello stato di maturazione dell’uva alla raccolta e della varietà del vitigno. Nel corso della fermentazione alcolica, la sua concentrazione varia in base alla specie e al ceppo di lievito impiegato.

Questo acido può subire, nel corso dell'elaborazione dei vini, una degradazione ad opera dei batteri lattici e quindi influenzare le loro caratteristiche organolettiche.

L'**acido citrico**, nei vini è presente in quantità comprese tra 0.1 - 0.8 g/L, questo ha un ruolo importante sotto l'aspetto metabolico e biochimico, infatti può essere utilizzato come fonte energetica dai batteri per la fermentazione malolattica e quindi, la sua concentrazione nei vini che hanno subito questa fermentazione, è di pochi mg/L.

L'acido citrico, inoltre, è ammesso per legge (assieme all'acido tartarico) per la correzione dell'acidità dei vini.

I **composti fenolici**, sono presenti nei vini in concentrazioni che variano tra 400 - 4000 mg/L, a seconda della varietà di uva e il sistema di vinificazione adottato. Questi composti conferiscono al vino colore e gusto, hanno capacità coagulante nei confronti delle proteine e possono influire sullo sviluppo batterico, infatti alcuni composti fenolici possono inibire o stimolare la loro crescita.

Gli **zuccheri** che troviamo nel vino sono gli stessi di quelli che troviamo nel mosto, quindi il glucosio e il fruttosio, inoltre sono presenti zuccheri non fermentescibili come i pentosi che rappresentano, a fine fermentazione, la totalità degli zuccheri presenti nel vino.

Le **sostanze minerali** sono presenti sotto forma di anioni e cationi, che partecipano alla formazione del gusto del vino, apportando, in particolare la sensazione di “freschezza”. Il tenore di queste sostanze, nei vini è inferiore rispetto a quello dei mosti di origine, a causa della precipitazione del tartrato neutro di calcio e il tartrato acido di potassio, che si verifica durante la vinificazione e la conservazione.

Le **sostanze pectiche**, nei vini si riscontrano in piccole quantità rispetto al mosto, poiché nel corso della vinificazione sono idrolizzate e demolite da parte degli enzimi pectolitici.

Le **sostanze azotate**, presenti in forma assimilabile nel corso della fermentazione alcolica sono utilizzate dai lieviti, successivamente con la separazione delle fecce, mediate i travasi sono allontanate dal vino, che quindi contiene minori quantità di queste sostanze rispetto ai mosti di partenza.

Nei vini l'azoto si presenta sotto diverse forme:

- 1 Proteine: si trovano in piccola quantità in certi vini giovani e possono essere causa di velature e depositi che si producono in bottiglia;
- 2 Peptoni: responsabili con la loro coagulazione di intorbidamenti che si presentano in vini bianchi se esposti al calore o al freddo;
- 3 Polipeptidi: rappresentano il 60/90% dell' azoto organico presente nei vini, e hanno un peso molecolare inferiore ai peptoni;
- 4 Amminoacidi: rappresentano gli elementi costitutivi delle proteine, dei peptoni e dei polipeptidi, e sono utilizzati dai lieviti per il loro metabolismo azotato;
- 5 Azoto ammoniacale: presente in piccole quantità (mg/L).

Tra le componenti indirette, il più importante è l'**alcol etilico**, la cui concentrazione e i relazione diretta con la composizione zuccherina del mosto di provenienza e il potere alcoligeno dei lieviti. Questo composto è un ottimo solvente delle sostanze aromatiche, e contribuisce a esaltare l'aroma e il bouquet del vino, inoltre ha un azione protettiva

contro i batteri agenti di malattie. Il tenore in alcol etilico nel vino, è variabile, e la legge stabilisce una gradazione alcolica minima per i vini da immettere nel mercato.

Il **glicerolo**, (o glicerina) è un polialcololo, e deriva direttamente dalla fermentazione alcolica. La sua concentrazione è variabile da 4 a 10 g/L, e dipende dal contenuto iniziale in zuccheri, dalla specie dei lieviti e dalle condizioni di fermentazione. Questo composto conferisce al vino morbidezza grazie alla sua oleosità e il suo sapore dolce.

L'acido succinico, si forma durante la fermentazione, e il suo tenore nei vini rimane invariato durante la conservazione e l'invecchiamento, poiché non viene degradato da microrganismi presenti nel vino.

In base al ceppo di lievito utilizzato, l'acido succinico prodotto può raggiungere concentrazioni che oscillano tra 0,2 e 1,5 g/L, quindi la sua quantità risulta decisiva nella determinazione dell'acidità fissa.

L'acido acetico si forma anch'esso durante la fermentazione alcolica e il suo contenuto nel vino è in relazione principalmente con il genere e la specie del lievito, la temperatura di fermentazione e la concentrazione di zuccheri nel mosto. Nel corso della conservazione può avvenire un aumento della sua concentrazione nel caso che nel vino si ha uno sviluppo di batteri acetici, che provocano l'ossidazione dell'alcol ad acido acetico rendendo il vino acescente, oppure a causa dello sviluppo di batteri lattici indesiderati. Nella maggior parte dei vini la sua concentrazione varia da 0,2 a 0,6 g/L.

L'acido lattico, si origina nel corso della fermentazione e la sua presenza non è necessariamente un indice di alterazione. Questo acido organico può prendere origine ad opera dei lieviti nel corso della fermentazione, ad opera dei batteri agenti della fermentazione malolattica e infine nei vini alterati, per fermentazione da parte di batteri lattici eterofermentanti di zuccheri ed altri costituenti del vino.

Inoltre, nel vino sono presenti in quantità limitate composti come:

acetilmetilcarbinolo

2,3-butilenglicole

β-feniletanolo

diacetile

Tra questi, il composto presente in maggior quantità è *2,3-butilenglicole* che raggiunge concentrazioni di 0,3-1,5 g/L, anche se questa presenza viene mascherata dal glicerolo presente in quantità superiori.

Quindi dal punto di vista chimico, il vino, è più precisamente una soluzione idroalcolica formata da sostanze contenute negli acini di uva (quali acqua, glucosio, fruttosio, acido tartarico citrico e malico, tannini e sostanze coloranti, albumine, vitamine e enzimi) e da prodotti provenienti dalla fermentazione del mosto e delle vinacce (quali alcol etilico, glicerina, esteri, aldeidi, 2-3 butilenglicole, alcoli superiori e anidride carbonica).

Tutte le fasi che portano dalla materia prima, l'uva, al prodotto finale, il vino, prendono il nome di **vinificazione**, che a sua volta si distingue principalmente in vinificazione in bianco per ottenere i vini bianchi e vinificazione in rosso per ottenere i vini rossi

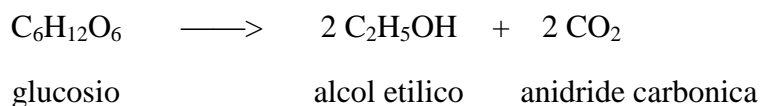
Dalla prima fase della vinificazione, ovvero la pigiatura, si ottiene il mosto d'uva, il quale, viene raccolto in tini ed eventualmente corretto in modo da ottenere la quantità di zucchero, l'acidità e il colore desiderati.

La fase successiva è la **fermentazione** del mosto, la quale nella vinificazione in bianco avviene senza vinacce invece nella vinificazione in rosso in presenza di vinacce.

La fermentazione è il processo di trasformazione biochimica grazie al quale dagli zuccheri dell'uva si forma principalmente alcol etilico.

Nel mosto d'uva i fattori della fermentazione alcolica sono i lieviti, microrganismi presenti in grande quantità sulle bucce degli acini d'uva.

I lieviti maggiormente rappresentati nel mosto, appartengono al genere *Saccharomyces*. Dalla formula chimica si deduce che da glucosio si ottengono, per via fermentativa, alcol etilico e anidride carbonica.



Il glucosio viene prima trasformato in acido piruvico attraverso la via metabolica della glicolisi, in cui una molecola di NAD^+ si riduce a $\text{NADH} + \text{H}^+$, l'acido piruvico viene quindi decarbossilato dall'enzima piruvato decarbossilasi per formare l'acetaldeide e quindi, in seguito all'azione dell'alcool deidrogenasi, si forma l'etanolo con contemporanea riossidazione del $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ , che può ridursi durante la glicolisi. Successivamente a secondo dei casi si può avere una deviazione metabolica del normale percorso, con produzione più o meno consistente di prodotti secondari; in presenza di solfiti, ad esempio, l'acetaldeide è bloccata irreversibilmente e non viene ridotta ad etanolo, per cui per ottenere un NAD^+ nella forma ossidata si forma glicerolo dal diidrossiacetonfosfato. In ambiente alcalino, invece, l'acetaldeide viene ossidata ad acido acetico e ridotta a etanolo, e ciò comporta la formazione di glicerolo necessaria per riossidare il $\text{NADH} + \text{H}^+$ a NAD^+ . Questa reazione di ossido riduzione dell'acetaldeide è responsabile della produzione di acido acetico che si verifica sempre nel corso di una normale fermentazione alcolica.

L'energia prodotta dalla reazione, in parte viene immagazzinata sotto forma di ATP, e in parte viene dissipata sotto forma di calore.

I lieviti utilizzano questa via metabolica per la produzione dell'energia che è necessaria al loro sostentamento; in altre parole i lieviti si nutrono di zuccheri ed espellono come rifiuti, l'anidride carbonica e l'alcol etilico.

Durante la **vinificazione**, che può compiersi in un periodo compreso, tra 24 ore e una settimana, a seconda della tipologia della materia prima e delle tecniche di vinificazione utilizzate, si ottengono una serie di prodotti intermedi che conferiscono il caratteristico bouquet, ovvero il gusto, la fragranza e l'aroma al prodotto finale cioè il vino. Parallelamente all'alcol etilico, la fermentazione produce, in ugual proporzione, anidride carbonica, la quale è presente nel vino sia sotto forma di bollicine gassose, sia come acido carbonico in soluzione. Dopo la pigiatura il processo fermentativo si avvia in modo piuttosto tumultuoso e procede molto velocemente, la quantità di zuccheri presenti nel mosto è molto alta e i lieviti sono estremamente attivi, se tutto procede bene

la fermentazione continua fino a quando vengono fermentati quasi tutti gli zuccheri lasciando a fine processo fermentativo solo tracce di zuccheri residui. A seconda della tipologia di vino che si vuole ottenere, ci sono delle varianti per quanto riguarda il processo di vinificazione.

A questa fermentazione definita primaria segue, a seconda anche della tipologia di vino che si vuole ottenere, una seconda forma di fermentazione la cosiddetta **fermentazione malolattica**.

I vini pregiati provenienti da uve di zone tipiche, raccolte a perfetta maturazione, scelte e sane subiscono, prima di essere imbottigliati, un **invecchiamento naturale**. L'invecchiamento può durare anche 7-8 anni e risultati migliori si ottengono usando botti di rovere. I vini invecchiati sono caratterizzati dalla presenza di esteri, aldeidi e acetati, che danno profumi particolari e che si formano nel tempo; nel corso del processo di invecchiamento il vino si impoverisce delle sostanze coloranti e dei tannini che precipitano. Prima di essere messo in commercio, il vino viene filtrato e chiarificato.

CAPITOLO 2

I BATTERI LATTICI

Sino alla fine del XIX secolo, il vino è stato considerato il frutto della sola fermentazione alcolica condotta dai lieviti, attribuendo alle eventuali successive trasformazioni una valenza del tutto negativa. Pasteur, nei suoi *Etudes sur le vin* del 1866, identificava proprio i batteri lattici come i maggiori responsabili delle alterazioni dei vini. Ci sono voluti circa cinquant'anni affinché il giudizio di Pasteur fosse in parte modificato con il riconoscimento che i batteri lattici, trasformando l'acido L-malico in acido L-lattico, potevano svolgere nel vino un'azione utile. In effetti, i primi contributi fondamentali sul ruolo dei batteri lattici e della fermentazione malolattica sono stati condotti tra il 1912 e il 1918, ma solo negli anni cinquanta si è avuto la chiara percezione dell'importanza di questo processo dal punto di vista enologico. Successivamente, la mole imponente di ricerche scientifiche ha portato alla completa conoscenza del biochimismo della degradazione dell'acido malico e ha chiarito che i batteri lattici, insieme a questa trasformazione, possono compiere, a carico di altri substrati presenti nel vino, reazioni che portano a modificazioni ben più complesse delle caratteristiche organolettiche del prodotto finito. Tuttavia, se nel loro insieme tali trasformazioni esplicano un effetto positivo o negativo sulla qualità del vino, è ancora oggetto di opinioni contrastanti. In ogni caso, la piena comprensione delle reazioni che accompagnano la fermentazione malolattica non può prescindere dalla conoscenza dell'eco-fisiologia dei batteri lattici così come dei fattori fisico-chimici e biologici, caratteristici dell'ambiente vino, che possono influenzare la loro attività metabolica.

2.1 Definizione e generalità

Nei mosti i batteri lattici, generalmente, si ritrovano con una carica cellulare di circa 10^4 UFC/mL. La maggior parte di essi non riescono a tollerare l'ambiente ostile che si viene a creare durante la fermentazione alcolica, ed infatti tendono a scomparire, però alcune specie, come *O. oeni*, riesce ad adattarsi e quindi a resistere. Questa specie, inoltre, riesce a tollerare anche bassi valori di pH, infatti si riscontra molto facilmente in vini con pH inferiori a 3,5 (Dicks and Endo, 2009). Nei vini con pH superiore a 3,5 possono ritrovarsi, invece, oltre che a *O. oeni* una più vasta gamma di batteri lattici appartenenti sia al genere *Lactobacillus* quali principalmente le specie *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. casei*; al genere *Pediococcus* quali principalmente le specie *P. damnosus* e *P. pentosaceus* e al genere *Leuconostoc* quali le specie *L. mesenteroides* e *L. gracile*.

Durante la fermentazione malolattica, la popolazione batterica totale attraversa diverse fasi. Durante i primi giorni della vinificazione, i batteri sono presenti in quantità molto variabile, compresa di solito tra 10^2 e 10^4 UFC/mL. Il livello della popolazione dipende certamente dalle condizioni climatiche degli ultimi giorni di maturazione dell'uva. Durante i primi giorni di fermentazione alcolica, i batteri e i lieviti si moltiplicano e, questi ultimi presenti con una carica cellulare maggiore colonizzano rapidamente il mezzo. Durante questo periodo, i batteri si moltiplicano, ma la loro crescita resta limitata ad un valore ottimale dell'ordine di 10^4 - 10^5 UFC/mL. Il loro comportamento dipende molto, a questo punto, dal pH del mezzo e dalla solfitazione. Durante la fase più attiva della fermentazione alcolica e fino alla degradazione degli zuccheri, i batteri diminuiscono rapidamente e generalmente tendono a moltiplicarsi dopo la svinatura del vino se trovano le condizioni adatte. Se i batteri si moltiplicano attivamente prima che sia terminata la fermentazione alcolica, possono fermentare gli zuccheri seguendo la via eterofermentativa e provocare un aumento dell'acidità volatile del vino.

2.2 Evoluzione dei batteri lattici durante la vinificazione

Durante tutto il corso della vinificazione, i batteri lattici subiscono un'evoluzione non solamente come numero, ma anche come varietà di specie. I batteri, isolati dalle uve prima della vendemmia appartengono alle specie *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. casei* ed *O. oeni*, che diventa più tardi la specie più importante e che è infatti poco presente all'inizio della vinificazione. I mosti d'uva, subito dopo l'arrivo nelle vasche, contengono una microflora molto varia, appartenente generalmente ai lattobacilli e cocchi (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. damnosus*, *P. pentosaceus*, *L. mesenteroides*, *O. oeni*).

Non tutte le specie sono sempre rappresentate, il fatto certo è che la selezione naturale opera progressivamente nel corso della fermentazione alcolica, infatti a fine fermentazione la specie che poi si ritrova principalmente nel vino è *O. oeni*. Prima del 1995 esso era classificato come *Leuconostoc oenos* ma in seguito a studi riguardanti le caratteristiche fisiologiche e relazioni filogenetiche si è giunti alla conclusione di istituire un nuovo genere che, pur presentando molte affinità con il genere *Leuconostoc*, rappresenta un gruppo a sé stante.

I generi comunemente presenti in ambito enologico sono i seguenti: *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003)

Genere *Lactobacillus*

Comprende batteri lattici a forma bastoncellare, con dimensioni che variano da 1-10µm di lunghezza. Questo genere viene convenzionalmente suddiviso in 3 gruppi: omofermentanti obbligati, eterofermentanti facoltativi e eterofermentanti obbligati.

Il gruppo degli omofermentanti obbligati comprende microrganismi che fermentano gli esosi con produzione esclusivamente di acido lattico. Di questo gruppo fanno parte ad esempio le specie *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*.

Il gruppo degli eterofermentanti facoltativi è costituito da lattobacilli che formano acido lattico per fermentazione degli esosi ma in carenza di zuccheri sono anche in grado di

produrre acido acetico, etanolo e acido formico, inoltre essi fermentano anche i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. Nei mosti e nei vini si ritrovano le specie *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. pentosus*.

L'ultimo gruppo comprende lattobacilli eterofermentanti obbligati che fermentano gli esosi con formazione di acido lattico, acido acetico, anidride carbonica. Inoltre essi fermentano i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. In questo gruppo troviamo le specie *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. collinoide*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans*.

Genere *Oenococcus*

Questo genere è stato proposto nel 1995 con la riclassificazione della specie *Leuconostoc oenos* in *Oenococcus oeni* (Versari *et al.*, 1999). Morfologicamente si tratta di cellule di morfologia coccica, disposte in coppia o in catenelle, le dimensioni sono di circa 0,5 µm. Si tratta di microrganismi eterofermentanti e anaerobi facoltativi. La specie più importante di questo genere dal punto di vista enologico è *O. oeni*, in quanto è la maggiore responsabile della fermentazione malolattica. Sono stati condotti numerosi studi su questa specie ai fini di valutare la sua resistenza in condizioni di stress presenti nel vino, come pH basso e alte concentrazioni di etanolo. Per questa specie infatti gli optimum di crescita di pH sono 4,3-4,8. *O. oeni* svolge un ruolo chiave nella fermentazione malolattica dei vini, è anaerobio facoltativo e richiede un terreno di crescita complesso con diversi amminoacidi e fattori di crescita. *O. oeni* è acidofilo e cresce meglio in terreni con pH compreso tra 4,2-4,8; la crescita è stimolata dalla aggiunta dello 0,05% di cisteina HCl. Le colonie sono di forma circolare, piccole, grigie o bianche con presenza o meno di striature, il diametro non supera il millimetro. La temperatura ottimale di crescita è compresa in un range tra i 20 e 30°C, ma è capace di crescere anche a 5°C; con il diminuire della temperatura, la crescita diventa molto lenta, infatti, può essere anche di 22 giorni (Serpa-Pimentel *et al.*, 1994). *O. oeni* è eterofermentante, in condizioni di microaerofilia converte il glucosio in modo equimolecolare in etanolo e CO₂ attraverso una combinazione di esosi monofosfati e pentosi fosfati. Due sono gli enzimi chiavi presenti in *O. oeni*: G6PH, X5P. Recenti studi hanno dimostrato che le cellule di *O. oeni* producono più ATP in presenza di L-malato, ciò dimostrerebbe che gli enzimi della malolattica presenti in essi producono più energia in un mezzo nutritivo a pH basso come il vino; e inoltre che la crescita è agevolata in presenza di etanolo. *O. oeni* è filogeneticamente differente dai *Leuconostoc* non acidofili e *Lattobacilli*, ciò deriva dal confronto delle sequenze 23s e 16s rRNA, e DNA-rRNA. Esso è distinguibile dagli altri *Leuconostoc* per l'incapacità di fermentare lattosio, maltosio e saccarosio; mentre fermenta glucosio, fruttosio e trealosio.

Genere *Pediococcus*

Sono microrganismi omofermentanti, le cellule hanno forma coccica di dimensioni di circa 1-2µm. La particolarità di questo genere è che la divisione cellulare avviene contemporaneamente su due piani perpendicolari, generando le caratteristiche tetradi composte da 4 cellule (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003). Si tratta di specie omofermentanti che hanno un optimum di temperatura di 25°C e di pH compreso tra 3,5 e 6,2. Sono microrganismi tipici dei vegetali e dei cibi fermentati e contaminanti della birra. Di

questo gruppo sono state riscontrate in vino le specie *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*. Nel vino queste specie causano una malattia il filante, dovuta alla produzione di polisaccaridi extracellulari come i composti D-glucanici.

Genere *Leuconostoc*

Si tratta di microrganismi eterofermentanti che per fermentazione degli zuccheri producono acido lattico, etanolo, anidride carbonica e acido acetico. Le cellule sono di forma sferica o leggermente allungata con dimensioni di circa 0,5-0,7 μ m. La divisione cellulare avviene su un piano con formazione di coppie o di catenelle. L'unica specie del genere riscontrata nel vino è *L. mesenteroides*, una specie che si trova in particolare nei mosti all'inizio del processo di vinificazione (Lonvaud-Funel, 1999).

2.3 *Lactobacillus plantarum* nel vino

Si tratta di una specie ubiquitaria, che si trova facilmente in matrici vegetali dove è responsabile delle fermentazioni dei prodotti alimentari, ma è anche un diffuso abitante dell'intestino nell'uomo e grazie alle sue proprietà probiotiche trova importanti impieghi sanitari (Torriani *et al.*, 2001). Viene frequentemente utilizzato come starter in molte industrie alimentari che si occupano di prodotti da forno, prodotti lattiero-caseari, bevande fermentate e per la conservazione di carne e pesce grazie alla sua azione antiputridogena. Il genoma del ceppo WCSG1 è stato il primo della specie ad essere completamente sequenziato nel 2003. Recentemente è stata completata la sequenza di un secondo genoma (ceppo JDM1) con diverse funzioni probiotiche (Zhang *et al.*, 2009).

Questa specie ha una rilevanza particolare in enologia: grazie alla sua capacità di condurre la fermentazione malolattica, viene spesso isolato da vini rossi durante la fermentazione malolattica (Spano *et al.*, 2007), ma è anche uno dei batteri presenti in maggiore concentrazione sui grappoli d'uva alla vendemmia (Bae *et al.*, 2006), inoltre è responsabile di una serie di difetti dei vini e della produzione di composti sgradevoli come le ammine biogene e l'etilcarbammato (Lonvaud-Funel, 1999). *L. plantarum* proveniente dall'ambiente enologico cresce bene anche a pH bassi: fino a pH 3,3 circa si ha una diminuzione media di solo il 20% del tasso di crescita, inoltre tollera bene concentrazioni di etanolo fino al 13% e il suo optimum di temperatura è di circa 30°C (G-Alegria *et al.*, 2004).

Questa specie, essendo eterofermentante facoltativo, possiede infatti tutti gli enzimi delle vie metaboliche degli zuccheri e cioè quella omofermentativa degli esosi, quella eterofermentativa del glucosio, ma può anche utilizzare i pentosi, attraverso la via dei pentosi fosfati. *L. plantarum* possiede anche una serie di *pathway* alternativi per metabolizzare acidi organici in carenza di zuccheri. Queste vie metaboliche sono estremamente importanti perché gli permettono di sfruttare una serie di composti largamente presenti nel vino, tra questi l'acido citrico, il glicerolo, l'acido tartarico e soprattutto l'acido malico attraverso la fermentazione malolattica. Come agente della fermentazione malolattica, *L. plantarum* è responsabile del decremento dell'acidità dei vini e di un miglioramento dell'aroma e del gusto degli stessi (Bravo-Ferrada *et al.*,

2013); come agente alterante può causare un incremento dell'acidità volatile e in alcuni casi, come detto sopra, anche la degradazione dell'acido tartarico portando ad un deprezzamento della qualità dei vini. Le altre reazioni di degradazione degli acidi organici sono invece considerate negative, dal punto di vista tecnologico, in quanto portano alla produzione di composti sgradevoli. Dal metabolismo dell'acido citrico si produce, infatti, acetoino e diacetile che provocano un eccessivo sentore di burro, il metabolismo dell'acido tartarico invece (acido organico maggiormente presente nel vino) ha un effetto negativo in quanto aumenta l'acidità volatile e riduce quella fissa, infine dal metabolismo del glicerolo (principale composto secondario prodotto dal metabolismo dei lieviti) si producono sostanze come l'acroleina che influiscono negativamente sulla qualità del vino.

L. plantarum è in grado di ricavare energia direttamente da alcuni aminoacidi in assenza di altri nutrienti, attraverso la decarbossilazione degli aminoacidi presenti nel vino. Dalla degradazione degli aminoacidi alcuni batteri lattici, tra cui anche *L. plantarum*, possono portare alla produzione di ammine biogene: basi organiche a basso peso molecolare che ad alte concentrazioni provocano mal di testa, allergie, problemi respiratori e cardiaci. In letteratura però ci sono forti indicazioni che *L. plantarum* non sia tra i maggiori produttori di ammine biogene o comunque che ne produca in quantità decisamente inferiore rispetto ad altri batteri lattici (Moreno-Arribas *et al.*, 2003; Arena *et al.*, 2001; Spano *et al.*, 2004). Questa caratteristica rende interessante la sua applicazione come starter in quanto potrebbe condurre la fermentazione malolattica senza rischi di alterazioni dovute alla produzione di ammine biogene, generalmente sintetizzate da *O. oeni*, principale specie proposta ed utilizzata come starter.

Oltre alla fermentazione malolattica, numerose sono le proprietà tecnologiche della specie *L. plantarum* tra cui la produzione di batteriocine.

Il vino è un mezzo molto ostile per la crescita dei batteri lattici, la loro evoluzione è strettamente correlata alla percentuale di alcol, al pH, alla concentrazione di SO₂, alla temperatura e dalla presenza o meno di fattori di nutrizione come fonti di carbonio, di azoto e vitamine. Numerosi studi hanno mostrato che la resistenza dei batteri lattici nel vino dipende anche dai ceppi batterici coinvolti (Britz and Tracy, 1990; Izquierdo *et al.*, 2003).

L'utilizzo di colture starter di batteri lattici si è ampiamente diffusa per il controllo del processo della fermentazione malolattica e per prevenire soprattutto la comparsa di off-flavour in seguito a sviluppo nel vino di batteri indigeni e quindi a fermentazioni malolattiche spontanee non gradite .

L'isolamento di batteri lattici indigeni, in particolare ceppi di *L. plantarum* da vini autoctoni, la loro selezione e il loro eventuale utilizzo come potenziali colture starter per fermentazione malolattica, rappresenta uno dei punti cruciali ed importanti per l'enologia, poiché permette di ricollegare i ceppi il più possibile al territorio in modo da sfruttare sia il loro naturale adattamento alle caratteristiche chimico-fisiche del vino e contemporaneamente mantenere le peculiarità regionali (Zapparoli *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2004).

Come detto precedentemente *O. oeni* è la specie più comunemente usata come coltura starter, ma alcuni autori hanno riportato che *L. plantarum* sembra essere un'alternativa più efficiente ad *O. oeni* come coltura starter nel processo di vinificazione (Prahl *et al.*,

1989). Questo nuovo approccio ha dato risultati soddisfacenti, infatti ceppi selezionati di *L. plantarum* hanno dimostrato di possedere una elevata attività malolattica anche a bassi valori di pH, capaci di metabolizzare pochissimo zucchero e, di notevole importanza, incapaci di produrre acido acetico (Prahl *et al.*, 1989.). L'efficienza di avviamento della fermentazione malolattica dipende dalla capacità del ceppo di sopravvivere e proliferare nel vino. La resistenza alle condizioni difficili del vino è strettamente ceppo dipendente, così l'isolamento, l'identificazione e la tipizzazione dei ceppi di *L. plantarum* naturalmente presenti nel vino subito dopo una fermentazione malolattica spontanea, sono passi importanti per lo sviluppo di nuovi starter malolattici, in grado di avviare e completare la fermentazione malolattica senza produrre composti intermedi indesiderati.

Studi recenti hanno mostrato che ceppi di *L. plantarum* posseggono un meccanismo di resistenza in grado di tollerare non solo i bassi pH ma anche alte concentrazioni di etanolo nel loro medium di crescita (G-Alegria *et al.*, 2004; Rojo-Benzares *et al.*, 2007).

2.4 Alterazioni nel vino dovuto allo sviluppo di batteri lattici

Le principali alterazioni provocate dai batteri lattici alteranti (Vincenzini *et al.*, 2005) in seguito ad un loro sviluppo nel vino sono:

Spunto lattico. In alcuni casi le condizioni di alta concentrazione di zuccheri, il basso pH e carenza di azoto rallentano l'attività dei lieviti durante la vinificazione, questo accade ad esempio quando le uve sono troppo mature e l'ambiente è molto caldo e secco prima della vendemmia. In queste situazioni la fermentazione alcolica è molto lenta o subisce un arresto e i batteri lattici possono svilupparsi precocemente prendendo il sopravvento sui lieviti. A causa della presenza di alte quantità di zuccheri esosi non fermentati dai lieviti, i batteri lattici possono utilizzare questa fonte di carbonio producendo alte concentrazioni di acido acetico e acido lattico con conseguente incremento dell'acidità volatile.

Filante. Si tratta di un'alterazione che si manifesta nei vini con bassa acidità con la produzione di esopolisaccaridi che conferiscono un carattere viscoso e untuoso al vino. E' opera delle specie del genere *Pediococcus*.

Agrodolce. Si manifesta con un aumento di viscosità del vino che acquisisce un sapore dolciastro, è dovuta all'azione di batteri lattici eterofermentanti come la specie *O. oeni* che riducono il fruttosio a mannitolo, da cui il sentore dolciastro assunto dal vino. Si manifesta nei vini con un valore di pH alto e con elevate quantità di zucchero residuo come fruttosio.

Girato. Si tratta di un'alterazione dovuta alla degradazione dell'acido tartarico da parte di *L. plantarum* e *L. brevis* con produzione di elevate quantità di acido

lattico e acetico e conseguente aumento dell'acidità volatile (Vincenzini *et al.*, 2005).

Amaro. Il sapore amaro dei vini è associato alla produzione di acroleina dalla degradazione del glicerolo, la reazione dell'acroleina con alcuni polifenoli del vino provoca l'amaro. Questa alterazione è dovuta all'azione delle specie *O. oeni*, *P. parvulus* e *L. mesenteroides* e specie del genere *Lactobacillus* che possiedono il corredo enzimatico per metabolizzare il glicerolo (Vincenzini *et al.*, 2005).

Altri possibili difetti che si possono riscontrare nel vino, con un conseguente cambiamento delle caratteristiche organolettiche degli stessi, possono essere dovuti a:

Elevata presenza di composti fenolici . E' dovuta alla produzione di un eccesso di fenoli volatili prodotti dalla degradazione dell'acido p-cumarico e ferulico da parte di lieviti *Brettanomyces* e di alcune specie di batteri lattici. Ad esempio *L. plantarum* possiede una ben caratterizzata decarbossilasi che metabolizza l'acido cumarico e ferulico nel vino e dell'uva. Un altro sentore sgradevole codificato con il termine "gusto di topo, che conferisce al vino un gusto che ricorda l'urina di topo, è causata primariamente da lieviti *Brettanomyces* ma anche da batteri eterofermentanti del genere *Lactobacillus* come *L. brevis*, *L. fermentum* e *L. hilgardii* (Bartowsky, 2009).

Elevata presenza di diacetile . Il diacetile conferisce un sentore di burro, presenta una soglia di percezione molto bassa (0,1-2mg/l) e può essere prodotto anche dai lieviti. *O. oeni* e alcuni batteri lattici del genere *Pediococcus* e *Lactobacillus*, possono produrre diacetile dalla degradazione dell'acido citrico. I suoi valori di desiderabilità variano a seconda dei vini ma in genere livelli maggiori di 5mg/l sono considerati indice di alterazione (Vincenzini *et al.*, 2005).

Nota di geranio. Questo difetto del vino si manifesta con un odore sgradevole simile a quello liberato dalla triturazione delle foglie di geranio. E' un'alterazione provocata dalla degradazione dell'acido sorbico (utilizzato come conservante chimico in alcuni vini) da parte dei batteri lattici eterofermentanti e *O. oeni*. Ha una soglia di percezione sensoriale bassa, di circa 0,1 µg/l (Bartowsky, 2009).

Infine rientra tra le alterazioni del vino la presenza di ammine biogene: si tratta di sostanze che influenzano la qualità del prodotto finito, inoltre la loro presenza nel vino può costituire un rischio per la salute del consumatore.

Le ammine biogene derivano dalla decarbossilazione degli aminoacidi. La pericolosità di questi composti deriva anche dal fatto che esse sono precursori di altre sostanze ben più tossiche come il carbammato di etile che è considerato carcinogeno (Vincenzini *et*

al., 2005). Le ammine biogene che principalmente si riscontrano nei vini sono: l'istamina, la putrescina e la tiramina che derivano dalla decarbossilazione degli aminoacidi più diffusi nel vino e cioè rispettivamente dall'istidina, dall'ornitina e dalla tirosina .(Lonvaud-Funel, 1999).

2.5 Criteri di selezione di batteri lattici di interesse enologico

Lo sviluppo delle biotecnologie e le migliori conoscenze sul metabolismo dei microrganismi coinvolti nei processi fermentativi, hanno consentito di evidenziare molti caratteri fisiologici sia dei microrganismi indigeni (Saguir *et al.*, 2009) sia di quelli aggiunti come starter.

Negli ultimi anni le industrie enologiche fanno uso di colture starter di batteri lattici per promuovere una rapida bioconversione dell'acido malico ed ottenere vini con caratteristiche compositive desiderate.

Per quanto concerne la selezione di batteri lattici di interesse enologico essa tiene conto di caratteristiche tecnologiche/qualitative quali:

:

- Capacità di sviluppo a bassi valori di pH.
- Resistenza all'etanolo fino al 15% o più.
- Resistenza all'anidride solforosa.
- Sviluppo a basse temperature.
- Produzione di composti indesiderati.
- Produzione di ammine biogene.
- Produzione di batteriocine.
- Vigore fermentativo.
- Resistenza ai batteriofagi.
- Interazione con i composti polifenolici.

CAPITOLO 3

LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

La fermentazione malolattica è il più importante fenomeno biologico nel vino che avviene durante o alla fine della fermentazione alcolica, ed è effettuata da una o più specie di batteri lattici. La reazione chimica che sta alla base di questa fermentazione è la trasformazione dell'acido L-malico, un acido con due funzioni carbossiliche, in acido L-lattico, con una sola funzione carbossilica (Stratiotis *et al.*, 2002), come conseguenza diminuisce la capacità di liberare idrogenioni nel mezzo con un conseguente innalzamento del pH. Questa trasformazione è un processo endotermico infatti non c'è sviluppo di energia tale da soddisfare le esigenze dei batteri lattici, infatti essi si procurano l'energia necessaria metabolizzando le piccole quantità di zuccheri residui nel vino, sia esosi che pentosi (glucosio, fruttosio, arabinosio e trealosio).

Avendo una diminuzione delle funzioni acide conseguentemente accade che abbiamo anche una diminuzione della solubilità dei sali dell'acido tartarico, il pH si alza, si liberano ioni potassio che in parte erano legati al tartarico per salificarlo ed a questo punto diventano disponibili nel mezzo. Altro aspetto importante è il metabolismo del citrato, uno dei maggiori acidi organici presenti nelle uve insieme al malato e al tartrato, poiché i batteri lattici sono in grado di metabolizzarlo in presenza di glucosio, portando alla formazione di lattato, acetato (acidità volatile), diacetile (nota di burro), acetoino e 2,3-butandiolo. Molti batteri lattici possono anche produrre una certa quantità di polisaccaridi, per esempio *P. damnosus* produce un β -D glucone composto da un trisaccaride unito a D-glucosio (Llaubères *et al.*, 1990).

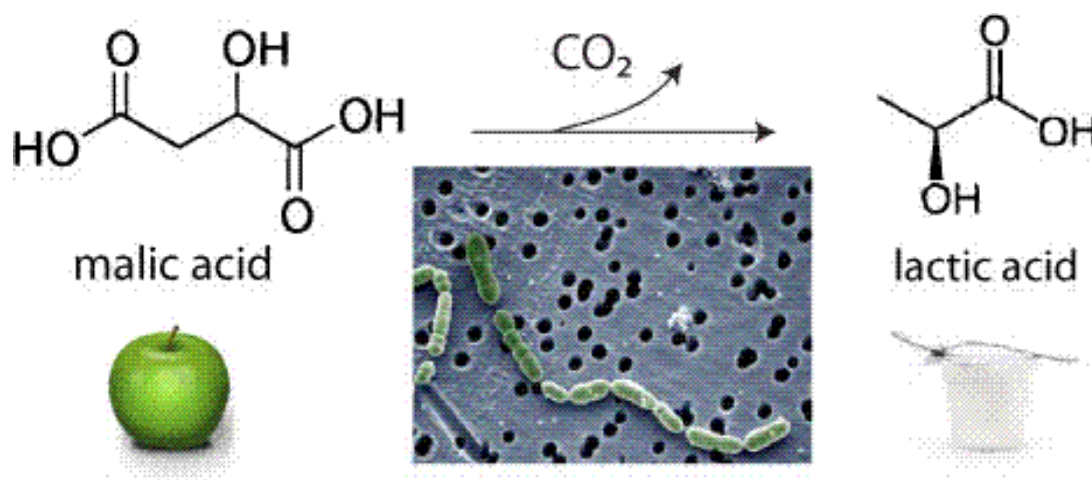
La fermentazione malolattica comporta:

- ❖ una diminuzione dell'acidità totale del vino;
- ❖ un acido allappante, come il malato, è sostituito con un acido dal gusto più gentile, come l'acido lattico, rendendo il vino più morbido al gusto;
- ❖ migliora l'aroma in quanto aumenta la complessità aromatica del vino;
- ❖ aumenta la stabilità microbiologica del prodotto.

I batteri lattici sono in grado di sintetizzare nuovi composti e di trasformarne altri preesistenti, modificando anche in maniera marcata, il profumo e il gusto del prodotto (Saguir *et al.*, 2009). Questi cambiamenti sono dovuti in parte all'azione di enzimi i quali sono già naturalmente presenti nel mosto e parte sono di origine batterica. Infatti

la conversione dell'acido malico in acido lattico è dovuto proprio all'attività di un enzima specifico cioè l'enzima malolattico senza il rilascio di intermedi, Figura 1.

Figura 1 Chimismo della fermentazione malolattica



I cambiamenti di aroma dovuti alla fermentazione malolattica sono principalmente dovuta alla sintesi di:

- ❖ diacetile (aroma di burro)
- ❖ acetoino
- ❖ 2,3 butandiolo
- ❖ Acido acetico
- ❖ Altri composti

I batteri lattici sono in grado di contribuire alla formazione dell'aroma mediante la produzione di composti aromatici derivanti dalla degradazione degli amminoacidi. La quantità e il tipo di composti prodotti sono ceppo dipendenti ma una notevole influenza hanno anche la composizione del mosto e le operazioni di governo del vino.

Questa fermentazione costituisce un' importante tappa nel processo di maturazione e invecchiamento del vino (Prahl *et al.*, 1988).

La fermentazione malolattica è un fenomeno gradito in zone con clima più freddo, dove i mosti hanno spesso un eccesso di acidità ed è invece indesiderata nelle zone a clima caldo, dove le uve, spesso, vanno in sovra maturazione con conseguente abbassamento degli acidi organici (Sico *et al.*, 2008).

I batteri più importanti che effettuano la fermentazione malolattica sono appartenenti alle specie *O. oeni* e *L. plantarum* (Lonvaud-Funel., 1999).

Oltre allo svolgimento della fermentazione malolattica i batteri svolgono altre attività metaboliche che, in funzione del vino che vogliamo ottenere, possono portare ad un miglioramento o peggioramento delle caratteristiche compositive e sensoriali del vino (Barbagallo *et al.*, 2004). Il numero di batteri lattici aumenta subito dopo la rottura degli acini, durante la fase della pigiatura dell'uva fino a raggiungere un ciclo logaritmico

pari a 10^3 - 10^4 UFC/mL, per poi diminuire drasticamente durante la fermentazione alcolica ad opera dei lieviti. *O. oeni* e alcune specie di Lattobacilli sono comunque presenti durante tutta la fermentazione alcolica e durante tutta la durata della fermentazione malolattica (Swiegers *et al.*, 2005; Jackson, 2008).

O. oeni è probabilmente quello che si adatta meglio alle condizioni difficili che si riscontrano nel vino e per questo motivo colture starter di questa specie sono quelle che maggiormente si riscontrano sul mercato.

Recentemente si è visto però che alcune specie del genere *Lactobacillus* possono sopravvivere anche esse nelle condizioni ostili che si riscontrano nel vino, inoltre possiedono rispetto ad *O. oeni* delle caratteristiche importantissime. Infatti è stato dimostrato da diversi autori che molti Lattobacilli associati al vino, possiedono i geni che codificano per numerosi enzimi coinvolti nelle attività metaboliche quali: metabolismo del citrato, degli amminoacidi, dei polisaccaridi, dei polioli, catabolismo delle aldeidi, idrolisi dei glucosidi, sintesi ed idrolisi di esteri, degradazione di acidi fenolici, lipolisi, proteolisi e peptidolisi; e molti di questi enzimi sono attivi nelle condizioni di vinificazione (Du Toit *et al.*, 2011), inoltre hanno la capacità di produrre sostanze ad azione antimicrobica in grado di inibire lo sviluppo di batteri lattici indigeni. Nello specifico *L. plantarum* ha dimostrato geneticamente di possedere la gamma più diversificata di plantaricine, questa è una caratteristica importante come criterio di selezione di future colture starter in grado di dominare nel vino, riducendo anche le dosi di utilizzo della SO_2 .

L'evoluzione dei batteri lattici dal vitigno alle fasi finali di vinificazione è collegato principalmente alla collocazione geografica, al tipo di cultivar e alle procedure di vinificazione.

3.1 Fattori che influenzano la fermentazione malolattica

I principali fattori che influenzano la crescita dei batteri lattici e quindi la riuscita o meno della fermentazione malolattica sono:

- ❖ **pH:** questo è un parametro importante in quanto influisce sulla crescita dei batteri lattici ed inoltre influisce anche sul metabolismo del glucosio; infatti *L. plantarum* a bassi valori di pH è in grado di ottenere energia dalla metabolizzazione del malato anche in presenza di glucosio.
- ❖ **Etanolo:** come noto influisce sulla crescita dei batteri lattici. La tolleranza all'etanolo è ceppo-dipendente inoltre dipende anche dalla temperatura, dal pH e dal contenuto in azoto presente nel mezzo.
- ❖ **Temperatura:** questo parametro modifica le velocità di crescita dei batteri lattici. La temperatura ottimale di crescita dipende dai parametri chimico-fisici del vino, in particolare dal contenuto in etanolo, infatti un contenuto elevato in etanolo porterà ad una diminuzione della temperatura ottimale di crescita. Recentemente si è visto che *L. plantarum* è in grado di produrre in condizione di

stress termici delle proteine da stress e quindi essere in grado di tollerare o evitare numerose fluttuazioni ambientali.

- ❖ **Anidride solforosa:** influisce anch'essa sulla crescita dei batteri lattici e quindi sulla fermentazione malolattica. La sensibilità a questo antisettico è legata alla concentrazione e al pH del mezzo, infatti a bassi valori di pH la solforosa ha un'azione inibitoria maggiore perché c'è un'alta percentuale della forma molecolare (SO_2 molecolare) attiva. L'anidride solforosa è un antisettico particolarmente efficace sulla maggior parte dei batteri lattici, infatti ne risentono già a concentrazioni di 10-20 mg/L. occorre tuttavia tenere presente che quando si ottiene l'inibizione della fermentazione malolattica non significa che si è avuta la morte di tutti i batteri presenti nel vino, soprattutto nel caso di popolazioni batteriche numerose, una parte delle cellule non muore ma resta inattiva quindi la solforosa in questo caso esplica un'azione batteriostatica non battericida (Delfini and Morsiani, 1992).
- ❖ **Interazione con altri microrganismi:** principalmente con i lieviti. Infatti l'interazione con i lieviti può stimolare, inibire oppure avere alcun effetto sulla crescita dei batteri lattici; tutto questo dipende dall'associazione lievito-batterio. L'impatto negativo dei lieviti sui batteri lattici può essere dovuto alla produzione di alcuni metaboliti come: etanolo, SO_2 , sostanze antimicrobiche in particolare gli acidi grassi a media catena soprattutto l'acido decanoico. I lieviti al contrario possono stimolare la crescita dei batteri lattici e quindi la fermentazione malolattica, mediante la produzione di mannoproteine e il rilascio nel mezzo di sostanze nutritive derivanti alla loro autolisi al termine della fermentazione alcolica.
- ❖ **Sostanze polifenoliche:** tali sostanze possono inibire o stimolare la crescita dei batteri lattici, la loro azione è legata alla specie di batteri lattici, alla tipologia di sostanza polifenolica e alla sua concentrazione. Gli acidi fenolici quali l'acido ferulico e p-cumarico hanno un effetto inibitorio generalmente influiscono sulla permeabilità della membrana cellulare, invece l'acido caffeico stimola la loro crescita e anche la fermentazione malolattica però a basse concentrazioni. I flavonoidi quali la quercitina hanno un effetto inibitorio sui batteri lattici, nello specifico si è visto che soprattutto *O. oeni* è inibito invece al contrario su *L. plantarum* ha un effetto positivo sia su un incremento delle sue performance di crescita che sulla sua capacità fermentativa, inoltre la quercitina non viene metabolizzata così mantiene inalterate le sue proprietà antiossidanti.

3.2 Tecnologie di vinificazioni favorevoli e/o sfavorevoli alla fermentazione malolattica.

Seguire tecnologie di vinificazioni adeguate o meglio atte a creare condizioni favorevoli allo sviluppo dei batteri malolattici naturalmente presenti sulle uve e nei mosti, può essere utile per favorire la fermentazione malolattica.

Principalmente l'utilizzo di uve mature e di mosti con pH non inferiori a 3,2 con l'aggiunta di dosi di SO₂ inferiore ai 50mg/L, la ritardata sfeccatura dei vini appena fermentati e il riscaldamento delle masse vinarie, sono tutte fasi tecnologiche atte a favorire la fermentazione malolattica. Tutto ciò e soprattutto lavorare con mosti che presentano un pH alto maggiore di 3,5 però risulta molto pericoloso perché si possono avere anche proliferazione di specie batteriche non desiderate.

Mediare queste contrastanti situazioni tecnologiche non è facile per questo motivo numerosi ricercatori si sono spinti a trovare delle soluzioni alternative a queste fermentazioni malolattiche spontanee, mediante l'impiego di colture starter.

Fattori invece che possono giocare un ruolo nell'evitare innesco di fermentazioni malolattiche spontanee sono principalmente l'impiego di tecnologie di vinificazione che permettono di mantenere il pH del vino basso (chiarificare i mosti ecc) e principalmente utilizzare la SO₂ sia in fase di pigiatura e anche sul prodotto finito mantenendola ad una soglia tale che espliciti la sua azione antimicrobica.

3.3 Colture starter per fermentazione malolattica.

La vitalità cellulare dei preparati liofilizzati di batteri malolattici selezionati non è sempre ottimale per un adeguato inoculo che consenta di ottenere una sufficiente e rapida colonizzazione nel vino. Tuttavia, anche un'alta vitalità cellulare non è garanzia di successo della fermentazione malolattica, se i batteri non sono capaci di adattarsi al vino. Inoltre, la competizione della microflora indigena può essere così forte da “inquinare” il vino inoculato con le colture starter. Nella vinificazione la fermentazione malolattica è un importante processo mediato da batteri nel quale come detto precedentemente principalmente si ha la conversione dell'acido malico, presente nel mosto e nel vino, in acido lattico. In realtà questa reazione, dalla quale deriva il termine “malolattica” sebbene sia la più importante, è solo una delle tante trasformazioni chimiche correlate all'attività metabolica dei batteri malolattici presenti naturalmente nel mosto e nel vino. Infatti, oltre all'acido malico, altre sostanze costituiscono i substrati catabolici per le cellule microbiche, quali l'acido citrico, l'acetaldeide, gli acidi fenolici e i composti glicosilati (Ugliano *et al.*, 2003; Swiegers *et al.*, 2005; Couto *et al.*, 2006). Queste contribuiscono a modificare, in modo più o meno marcato, le caratteristiche chimico-fisiche del vino, comprese quelle organolettiche e rappresentano sicuramente l'evento più significativo della fermentazione (Lonvaud-Funel, 1999). Inoltre, la sottrazione di acido malico riduce il rischio di sviluppo di microrganismi responsabili di difetti del vino. Modificazioni positive dell'aroma e stabilità microbica sono quindi le conseguenze più evidenti della fermentazione malolattica nei vini, non

solo rossi, ma anche nei vini bianchi. Proprio per gli effetti che la fermentazione malolattica determina sul vino, l’attenzione dei produttori e degli enologi verso questo processo biologico è cresciuta in parallelo alla necessità di migliorare sempre di più la qualità del vino. Ciò ha incentivato lo studio sui batteri malolattici, portando in breve tempo ad un considerevole miglioramento delle conoscenze della loro attività nel vino, alla pari di quanto si è verificato precedentemente per i lieviti, quali responsabili della fermentazione alcolica (Tosi *et al.*, 2007).

Oggi, il risultato più tangibile di questo interesse è, non solo la disponibilità in commercio di colture batteriche da utilizzare come starter della fermentazione malolattica, ma anche di nutrienti (i cosiddetti “attivanti della fermentazione malolattica”) da aggiungere nel vino per facilitare la gestione di questo processo biologico durante la vinificazione.

L’impiego delle colture batteriche starter è entrata nella comune pratica enologica perché garantisce il successo della fermentazione malolattica e, soprattutto, la standardizzazione della qualità e della produzione del vino (Nielsen *et al.*, 1996; Rosi e Nannelli, 2005). Infatti, l’affidamento di questa fermentazione alla microflora spontanea, da una parte può generare deviazioni organolettiche non gradite e dall’altra può richiedere tempi di svolgimento non idonei alle esigenze di produzione.

Nonostante l’uso delle colture starter e di una corretta tecnologia enologica, la gestione della fermentazione malolattica in vino può essere in talune condizioni difficoltosa fino a portarle al fallimento. Spesso non è facile individuare le cause del loro insuccesso; per esempio, una frequente causa è dovuta all’inadeguatezza del ceppo batterico rispetto alle condizioni di cantina contingenti; oppure al non corretto utilizzo, da parte del produttore, del preparato batterico nelle opportune modalità; o ancora perché lo stesso preparato ha bassa vitalità cellulare.

3.4 Strategie di inoculo di colture starter per fermentazione malolattica.

Per avere il pieno controllo della fermentazione malolattica l’impiego di ceppi selezionati di batteri lattici rappresenta sicuramente la via più efficace poiché danno le maggiori garanzie sulla buona riuscita del processo. Infatti la selezione di ceppi di batteri lattici efficienti è diventata una delle principali sfide della ricerca applicata in enologia (López *et al.*, 2008).

Le colture starter di batteri lattici tradizionalmente sono aggiunte in vasca dopo la svinatura, il problema è che più si va avanti con la vinificazione e più l’ambiente diventa ostile nei loro confronti, infatti per le cellule batteriche è più semplice adattarsi ad un aumento progressivo dell’alcol che trovarsi improvvisamente in un substrato con concentrazione di etanolo elevate, inoltre per quanto concerne la vinificazione in rosso gioca un ruolo a loro sfavore l’accumulo di composti fenolici di cui alcuni di essi sono ben noti per gli effetti inibitori che possono avere nei loro confronti.

L’inoculo degli starter può avvenire in diverse tempistiche nello specifico:

- ❖ **Co-inoculo precoce**: i batteri lattici vengono inoculati quattro ore dopo l'inoculo dei lieviti, la fermentazione malolattica si avvia prima che la fermentazione alcolica termini.
- ❖ **Co-inoculo tardivo**: inoculo dei batteri lattici verso la fine della fermentazione alcolica, la fermentazione malolattica si avvia appena la fermentazione alcolica è terminata.
- ❖ **Inoculo sequenziale**: i batteri lattici vengono inoculati dopo la svinatura.
- ❖ **Inoculo di soccorso**: i batteri vengono inoculati quando ci si rende conto che i batteri indigeni non sono stati in grado di sviluppare.

Un inoculo a monte del processo fermentativo favorisce l'impiantazione degli starter poiché la concentrazione di etanolo e di polifenoli è bassa ed il substrato è abbastanza ricco di nutrienti utili per il loro sviluppo, però anche un inoculo verso la fine della fermentazione è accettabile poiché i batteri lattici vengono posti in un substrato un po' più limitante rispetto al caso precedente però non del tutto ostile.

Un co-inoculo precoce prevede un aspetto importante ovvero un'interazione lievito/batteri quali possono essere positive, neutre o di inibizione; quindi la scelta del ceppo di lievito diventa importante perché a seconda del ceppo la fermentazione malolattica potrà essere favorita, rallentata o inibita ad esempio non bisogna utilizzare ceppi che sono forti produttori di SO₂ e di acidi grassi a media catena poiché inibiscono i batteri.

Per evitare questa competizione con i lieviti ed evitare di esporre il substrato zuccherino alla presenza dei batteri l'inoculo maggiormente preso in considerazione ed utilizzato è quello tardivo. Per la buona riuscita dell'inoculo è importante evitare nelle prime ore rimontaggi, ossigenazioni o svinatura in modo da spingere i batteri verso il metabolismo anaerobico di degradazione del malico e non stimolare il consumo degli zuccheri.

CAPITOLO 4

INFLUENZA DEI BATTERI LATTICI SUL PROFILO SENSORIALE DEI VINI

La maggior parte dei composti aromatici che si ritrovano nel vino sono prodotti durante la fermentazione alcolica, nonostante ciò, comunque, il bouquet varietale è determinato da costituenti volatili che derivano direttamente dall'uva come terpeni, C13 norisoprenoidi, derivati del benzene (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A parte gli aromi odorosi in forma libera, presenti nelle bacche, ci sono una quantità significativa di aromi presenti come composti glicosilati quindi inodori e non volatili (Günata *et al.*, 1985; Maicas e Mateo 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Questi composti aromatici possono essere liberati dai loro precursori glicosilati da idrolisi acida o catalizzata da enzimi durante la vinificazione, ottenendo una modifica del profilo aromatico dei vini. L'idrolisi acida si verifica molto lentamente durante la conservazione del vino e può essere accelerata con il calore (Mateo e Jiménez, 2000), ma entrambi i processi possono indurre un deterioramento della qualità del vino. In contrasto con questo, l'idrolisi enzimatica può invece portare a un miglioramento dell'aroma naturale del vino senza avere effetti negativi sulla qualità del prodotto finale (Günata *et al.* 1998; Mateo e Jiménez 2000).

L'idrolisi enzimatica dei composti glicosilati può avvenire ad opera di enzimi presenti direttamente nell'uva oppure derivanti dai lieviti, però tali attività risultano molto lente durante la fermentazione alcolica a causa delle condizioni ostili.

Una rilevante attività glucosidasica è operata a carico dei batteri lattici responsabili della fermentazione malolattica. Numerosi studi hanno evidenziato che sia *O. oeni* che alcuni ceppi di lattobacilli hanno una spiccata ed importante attività glucosidasica (Grimaldi *et al.*, 2005a).

Il gene che codifica per la β -glucosidasi è probabilmente molto diffuso ed altamente conservato fra i batteri lattici del vino e la sua espressione è regolata da un ampio range di stress abiotici quali: temperatura, etanolo, pH (Spano *et al.*, 2005).

Alcuni ceppi di batteri lattici ben adattati nel vino, con una buona performance per quanto riguarda la fermentazione malolattica, rappresentano una potenziale fonte di enzimi β -glucosidasici capaci di operare nelle condizioni chimico-fisiche molto estreme presenti nel vino quindi influenzando la complessità aromatica degli stessi.

L'utilizzo di questi ceppi potrebbe essere un vantaggio rispetto ai lieviti perché i batteri lattici vengono di solito inoculati dopo la fermentazione alcolica quindi direttamente nel vino, ovvero in un sistema molto più stabile rispetto al mosto; inoltre i batteri lattici hanno meno attività enzimatiche indesiderabili, quindi possono interagire con alcuni componenti del vino influenzandone la loro qualità. Tutti questi fattori possono incrementare la specificità nei confronti dei composti glicosilati.

Numerose ricerche sono state condotte su ceppi di batteri lattici, soprattutto ceppi commerciali di *O. oeni*, dimostrando il potenziale valore dell'attività glucosidica di questi batteri per quanto riguarda il cambiamento sostanziale del flavour dei vini.

Tuttavia però non ci sono studi che hanno dimostrato la possibilità di utilizzare ceppi di batteri lattici selezionati esclusivamente per la loro attività β -glucosidica e quindi testati nelle difficili condizioni chimico-fisiche riscontrabili nei vini (Barbagallo *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni la maggiore richiesta dei consumatori verso tipologie di vino superiori, hanno spinto le industrie enologiche all'ottenimento di prodotti diversi ovvero con un profilo organolettico più complesso e vini con spiccate note di fruttato e floreale. L'aroma caratteristico di molti vini dipende come sappiamo dalla varietà dell'uva, questi aromi varietali possono essere presenti come composti volatili liberi e come precursori d'aroma; fra questi vi sono i precursori glucosidici che potrebbero essere considerati come un pool di composti aromatici dai quali potrebbero liberarsi composti volatili liberi durante la vinificazione o la conservazione dei vini (acido o enzimatica). I composti volatili che potrebbero essere rilasciati da questi precursori glucosidici sono principalmente terpeni, C13 n-isoprenoidi, derivati benzenici, fenoli volatili e composti C6 (Baumes, 2009; Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2011).

Questi composti possono fornire importanti caratteristiche aromatiche al vino, per esempio nel caso dei terpeni che sono poi i composti maggiormente presenti, potrebbero fornire note floreali caratteristiche proprio di alcuni vitigni come il Moscato (Etievant, 1991).

La capacità dei batteri lattici di rilasciare agliconi dai corrispondenti precursori glucosidici durante la fermentazione malolattica è già stata comprovata da numerosi autori (Hernandez-Orte *et al.*, 2009; Ugliano e Moio, 2006).

Inoltre molti autori hanno riscontrato e studiato la liberazione di agliconi e la loro evoluzione in vini in cui sono state impostate condizioni per accelerare il processo di invecchiamento (Loscós *et al.*, 2010) e durante l'invecchiamento dei vini sulle fecce (Loscós *et al.*, 2009b).

Quindi riepilogando, i precursori aromatici glucosidici possono essere un importante sorgente di composti aromatici, questo apre la possibilità di un loro utilizzo sia per rinforzare il profilo aromatico di vini ottenuti da varietà di uva non aromatica, sia per incrementare le caratteristiche organolettiche di vini de-alcolizzati e anche come agenti aromatizzanti in altre bevande a base di vino (Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2012).

4.1 Le sostanze polifenoliche nel vino e loro effetto sullo sviluppo dei batteri lattici

I polifenoli sono costituenti naturali dell'uva, si ritrovano principalmente nella buccia e nei vinaccioli e vengono estratte durante le fasi di vinificazione. Da un punto di vista chimico il termine “polifenolo” comprende un gruppo molto eterogeneo di composti caratterizzati da un anello aromatico con almeno un radicale idrossile e una catena laterale funzionale.

Da un punto di vista chimico possono dividersi in due grandi gruppi di composti:

- Flavonoidi (antociani, flavonoli, flavanoli, tannini).
- Non flavonoidi (ac. benzoico e cinnamico, alcoli fenolici, stilbeni).

La loro importanza in enologia è non solo perché influiscono sulle caratteristiche organolettiche dei vini come colore e fondamentale astringenza (Monagas *et al.*, 2006), ma anche per le proprietà benefiche associate a queste sostanze sulla salute soprattutto per la loro proprietà antiossidante, in quanto in grado di catturare i radicali liberi, donare elettroni o atomi di idrogeno o cationi metallici (Amarowicz *et al.*, 2004); questa attività e altre proprietà fisiologiche sono dovute alla reattività chimica dei fenoli la quale dipende dalla loro struttura chimica (Garcia-Ruiz *et al.*, 2008).

La concentrazione di composti fenolici nel vino è condizionata da vari fattori quali vitigno (varietà, annata, suolo, condizioni climatiche) e pratiche enologiche (tempo e temperatura di macerazione, concentrazione di SO₂, pressatura).

La fermentazione malolattica influisce sulla composizione fenolica nel vino (Fras *et al.*, 2014).

Il contenuto di antociani e polifenoli totali varia anche durante l'affinamento del vino in bottiglia.

Quindi in sintesi il contenuto in polifenoli totali si colloca intorno 150-400mg/L per i vini bianchi e 900-1400mg/L per i vini rossi giovani, nei vini rossi sono rappresentati tutti i gruppi fenolici mentre nei bianchi sono presenti principalmente gli acidi fenolici, flavanoli e flavonoli (Papadopoulou *et al.*, 2005). Le sostanze polifenoliche possono influire sulla crescita e sul metabolismo dei batteri lattici.

Gli acidi idrossicinnamici liberi sembrano influenzare la crescita di *L. plantarum* e altre specie del genere *Lactobacillus* responsabili di deterioramento; l'acido ferulico sembra più efficace degli acidi p-cumarico e caffeico; viceversa invece gli esteri di questi acidi non influenzano la crescita di *L. plantarum* (Salih *et al.*, 2000; Sánchez-Patán *et al.*, 2012).

Alcuni autori hanno riscontrato un effetto dose-dipendente di alcuni composti su studi condotti su *O. oeni* come l'epigallocatechina gallato che a concentrazioni comprese tra 400-500mg/L ha un effetto stimolante, mentre a concentrazioni maggiori di 500mg/L ha un effetto inibitorio (Theobald *et al.*, 2008).

Più recentemente è stato dimostrato, in mezzo sintetico, che la quercitina ha un effetto dipendente dal pH e dal dosaggio sul metabolismo di un ceppo di *L. plantarum* (Curiel *et al.*, 2010a). A pH 5,5 è stato osservato che la quercitina accelera il metabolismo degli zuccheri di questo ceppo e la produzione di acido lattico da acido malico; mentre a pH 6,5 è stata osservata una fase di latenza più prolungata.

L'interazione dei composti fenolici sulla crescita dei batteri lattici è dovuta ad una loro azione sulla membrana plasmatica con conseguente uscita all'esterno di componenti essenziali della cellula batterica come: proteine, ac. nucleici e ioni inorganici (Johnston *et al.*, 2003), con conseguente morte cellulare.

CAPITOLO 5

LE AMMINE BIOGENE

Le ammine biogene sono basi organiche a basso peso molecolare con attività biologica quali: ruolo nell'attività del cervello umano, regolazione della temperatura corporea e del pH dello stomaco, della secrezione gastrica, risposte immunitarie, crescita e differenziazione cellulare etc., formate principalmente per decarbossilazione di amminoacidi o attraverso aminazione e transaminazione di aldeidi e chetoni. Dall'ingestione di tali sostanze possono scaturire problemi tossicologici quando i livelli di ammine biogene sono elevati. A parte problemi di tipo tossicologici le ammine biogene sono in stretta relazione con l'igiene degli alimenti, infatti sono considerati come indicatori di processi di deterioramento in corso o difetti di fabbricazione (Karmas, 1981 ; Vidal-Carou *et al.*, 1990).

Si possono distinguere ammine naturali, presenti principalmente in frutta e ortaggi, e ammine biogene, presenti negli alimenti attraverso decarbossilazione di amminoacidi da parte di enzimi di origine microbica. Le ammine naturali che si ritrovano in alcuni alimenti non hanno alcun effetto tossico sulla salute del consumatore, in quanto sono presenti in moderate concentrazioni. Esistono però anche alcune eccezioni: l'ananas immaturo contiene circa 60 mg/Kg di serotonina, ma la concentrazione poi diminuisce fino a pochi milligrammi quando il frutto raggiunge la maturazione; nel lampone, invece, si possono ritrovare fino a 90 mg/kg.

A seconda della struttura chimica, le ammine biogene si possono classificare in:

- ❖ Alifatiche: putrescina, cadaverina, spermina e spermidina;
- ❖ Aromatiche: feniletilamina e tiramina;
- ❖ Eterocicliche: triptamina e istamina.

Le poliammine come la putrescina, la spermina, la spermidina e la cadaverina sono componenti indispensabili delle cellule vive e sono importanti nella regolarizzazione della funzione dell'acido nucleico, nella sintesi delle proteine e anche nella stabilizzazione delle membrane (Bardòcz, 1993); esse sono indispensabili per il metabolismo cellulare, nella crescita e nel rinnovo delle cellule e sono particolarmente richieste soprattutto nei tessuti caratterizzati da un elevato ricambio cellulare (Novella-Rodriguez *et al.*, 2003).

Gli amminoacidi precursori delle principali ammine biogene che si ritrovano negli alimenti e coinvolte in fenomeni di tossicità sono l'istidina, che porta alla formazione di istamina, la tirosina dalla quale si forma tiramina, idrossitriptofano dal quale si ottiene

la serotonina, il triptofano per la triptamina, la lisina per la cadaverina, l'ornitina per la putrescina e, infine, l'arginina per la spermina e la spermidina (Silla Santos, 1996). Le poliammide, come la spermina e la spermidina, non derivano direttamente da reazioni microbiche di decarbossilazione; cellule vegetali e animali sono in grado di sintetizzare le poliammine attraverso un processo che vede una decarbossilazione, seguita da altre specifiche reazioni enzimatiche. La putrescina, la cadaverina e l'agmatina possono avere origine sia da attività enzimatiche microbiche, sia grazie ad una sintesi endogena nelle cellule vive (Novella-Rodriguez *et al.*, 2003). Nella tabella 1 sono riportati i microrganismi associati alla produzione di ammine biogene durante la vinificazione.

Tabella 1 Microrganismi produttori di ammine biogene

Microrganismi associati alla produzione di ammine biogene durante la vinificazione (Moreno-Arribas *et al.*, 2010).

Specie	Funzione	Ammina biogena/attività metabolica
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lievito responsabile della	Istamina
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Lievito alterante	Agmatina, feniletilamina, etanolamina
<i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Lieviti autoctoni	Agmatina, feniletilamina, etanolamina
<i>Botrytis cinerea</i>	fungo	Tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina, spermidina
<i>Lactobacillus spp.</i>	Batteri lattici	Istamina (Istidina decarbossilasi)
<i>Pediococcus spp.</i>	fermentatori e alteranti	Tiramina (tirosina decarbossilasi)
<i>Oenococcus oeni</i>	Fermentazione malolattica	Putrescina (ornitina decarbossilasi) Feniletilamina
		Istamina (Istidina decarbossilasi)
		Putrescina (ornitina decarbossilasi)

5.1 Le Ammine biogene negli alimenti

Le condizioni necessarie affinché si sviluppino ammine biogene negli alimenti sono:

- ❖ La disponibilità di amminoacidi liberi, precursori delle ammine;
- ❖ Presenza di microrganismi decarbossilasi-positivi;
- ❖ Condizioni ottimali di crescita di questi microrganismi, condizioni ottimali per la sintesi di enzimi decarbossilasi e per espletare la loro attività.

In tutti gli alimenti che possiedono amminoacidi liberi e proteine si possono creare le condizioni necessarie per la formazione di ammine biogene. Esse possono ritrovarsi anche in cibi non fermentati e una concentrazione al di sopra di certi valori, potrebbe essere indice di una indesiderata attività microbica; tuttavia, la loro presenza non necessariamente deve essere correlata a una presenza di microrganismi, in quanto non tutti mostrano un'attività decarbossilasica. I batteri sintetizzano le ammine biogene poiché sono:

- ❖ un supplemento di energia;
- ❖ una protezione da stress acidi;
- ❖ una protezione da stress osmotici;
- ❖ altri ruoli possibili potrebbero essere la regolazione del DNA e come spazzini di radicali liberi.

Le ammine biogene si ritrovano in diversi alimenti, fermentati e non fermentati, come, ad esempio, il pesce, frutta e verdure, carne, latte, formaggi e prodotti lattiero-caseari, vegetali fermentati, vino e birra, prodotti fermentati a base di pesce. Il pesce è uno degli alimenti maggiormente conosciuti per quanto riguarda le intossicazioni da istamina; nel pesce ricco di istidina endogena la sua formazione può essere attribuita all'attività decarbossilasica di alcuni microrganismi o enzimi endogeni (Halász *et al.*, 1994; Brink *et al.*, 1990). L'istidina può essere soggetta a due diversi meccanismi catabolici, che possono portare alla formazione di istamina grazie a un'attività decarbossilasica a partire dall'amminoacido istidina, oppure di acido urocanico in seguito a una deaminazione dell'amminoacido. Tuttavia, la formazione dell'ammina biogena non è il principale catabolismo, ma avviene solo in alcune circostanze come la decontaminazione microbica. Ammine come la putrescina, la cadaverina, la tiramina, la spermina, l'istamina e la spermidina sono state ritrovate in diversi prodotti ittici, come nello sgombro, nelle sardine, nel tonno e nelle aringhe (Shalaby, 1996). Altri prodotti alimentari che possono contenere ammine sono la frutta e la verdura, come diversi succhi di frutta e nettari, e in particolare in questi è stata registrata la presenza di putrescina (Maxa and Brandes, 1993), le noci di cocco contengono la fenilettilammina. Nella carne di maiale, invece, sono state rilevate alte concentrazioni di spermidina, spermina e adrenalina, ma basse quantità di putrescina, cadaverina, istamina, tiramina e noradrenalina (Halász, 1994). Durante la conservazione, il contenuto di ammine biogene aumenta, fatta eccezione per la spermina e la spermidina che invece diminuiscono. La concentrazione di ammine biogene dipende dalla temperatura; infatti, carne di maiale conservata a 4°C risulta avere un livello di ammine inferiore rispetto a carne conservata a 30°C. Sicuramente, anche il deterioramento della carne porta a un aumento significativo di ammine biogene.

Per quanto riguarda le salsiccie, la fermentazione è un fattore importante per lo sviluppo di ammine biogene; infatti, la concentrazione di istamina aumenta di circa dieci volte durante il processo di maturazione. Sicuramente, la quantità di ammine biogene nelle salsiccie varia significativamente in base alla durata della maturazione, alla microflora fermentativa che può riportare diverse attività decarbossilasiche, al processo di maturazione, al tipo di carne utilizzata e alla qualità, alla biosintesi e al metabolismo di alcune ammine (Shalaby, 1996). Nel latte umano è stata rilevata la presenza di spermina, spermidina e putrescina in misura molto variabile. Il formaggio è un alimento implicato, come il pesce, nei fenomeni di intossicazione da istamina. Diversi tipi di ammine biogene sono state rilevate in vari tipi di formaggi: tiramina, istamina, cadaverina, putrescina, triptamina e fenilettilammina. Durante la maturazione avviene la degradazione delle caseine, che portano al rilascio di amminoacidi; essi possono fungere da substrati per l'attività decarbossilasica di alcuni microrganismi, portando alla formazione delle rispettive ammine biogene. Esse, quindi, aumentano durante il periodo di maturazione, soprattutto l'istamina, la putrescina e la cadaverina. Formaggi che sono soggetti a trattamenti ad alte temperature durante il processo di produzione possono contenere livelli apprezzabili di ammine biogene (El-Sayed, 1997).

Generalmente, formaggi soggetti a maturazione hanno una maggior concentrazione di

ammine biogene rispetto a formaggi non fermentati. Inoltre, significative differenze sono state riportate anche tra i diversi formaggi fermentati, dovute probabilmente all'intensità della maturazione, in quanto una maturazione prolungata porta a un maggiore accumulo di ammine biogene.

Per quanto concerne il vino, le ammine biogene sono riconosciute da tempo come responsabili di problemi di salute nell'uomo. In particolare, l'ammina maggiormente sotto accusa è l'istamina, che può provocare mal di testa e reazioni allergiche. Vari paesi hanno imposto dei limiti massimi per la presenza di istamina nel vino: in Svizzera, ad esempio, il limite massimo è di 10 mg/L. Un soggetto sano può comunque sopportare l'assunzione per via orale con gli alimenti di quantità anche elevate di istamina (comprese tra 200 e 500 mg). Ci sono studi clinici che contestano il ruolo delle ammine biogene, ed in particolare dell'istamina, nell'insorgenza di fenomeni di intolleranza al vino. È stato osservato, infatti, che i fenomeni di intolleranza non sarebbero collegati ai livelli di istamina e, quindi, si è arrivato a ritenere arbitrari i limiti imposti da taluni paesi ai livelli di questa sostanza. Per quanto riguarda le pratiche da seguire per limitare la presenza di ammine biogene nei vini, questo obiettivo può essere raggiunto con accorgimenti e tecniche compatibili con la vinificazione biologica. In primo luogo, occorre precisare che le ammine biogene sono di origine fermentativa. Provengono infatti dalla decarbossilazione degli aminoacidi ad opera di lieviti ed in particolare di batteri. L'aumento delle ammine biogene avviene dopo la fermentazione malolattica e dipende dal ceppo batterico utilizzato. Il contenuto è più elevato in caso di fermentazione malolattica spontanea. Il primo accorgimento, quindi, è quello di scegliere con attenzione il ceppo di batteri da impiegare nella malolattica, privilegiando quelli che presentano una bassa formazione di ammine biogene, cioè una bassissima capacità decarbossilante (Zambonelli, 2003).

Per quanto concerne la presenza di ammine biogene nel vino essa è importante dal punto di vista tossicologico ma non solo, perché la loro presenza provoca anche un notevole deprezzamento del prodotto. Il vino è un mezzo molto selettivo, infatti in esso possono crescere solo poche specie di batteri lattici quali principalmente *O. oeni* e alcune specie di lattobacilli alcuni di essi in grado di agire sugli aminoacidi con produzione di ammine biogene (Marcobal *et al.*, 2004; Granchi *et al.*, 2006).

Per quanto concerne la determinazione analitica delle ammine biogene negli alimenti, comprese il vino, ci sono diverse metodiche proposte, principalmente:

❖ **Uso di appropriati terreni di coltura**

Evidenziano l'innalzamento del pH dovuto alla formazione della base ammina. La composizione si rifà a quella dei terreni di coltura che permettono lo sviluppo ottimale delle specie in questione alla quale viene aggiunto l'aminoacido precursore nella quantità dell'1%.

È presente un indicatore di pH che indica il viraggio (es. bromocresol purple).

❖ **Test genetico**

Sono state descritte diverse coppie di primer “consenso” capaci di appaiare con geni per decarbossilasi appartenenti a specie batteriche diverse, screening degli isolati con questi primer (Coton and Coton, 2005).

❖ **Mediante HPLC**

Permette di vedere se c'è produzione di ammine biogene e di stimarne la concentrazione.

5.2 Tossicità delle ammine biogene

Le ammine biogene rivestono ruoli molto significativi nello svolgimento di alcune funzioni fisiologiche nell'uomo e negli animali, ma il consumo di alimenti contenenti alte concentrazioni di esse può causare effetti tossici più o meno gravi sull'organismo del consumatore. L'ammina maggiormente coinvolta in intossicazioni è l'istamina, che riguarda principalmente il consumo di pesce e formaggio. Essa esercita i suoi effetti legandosi ai recettori delle membrane cellulari del sistema cardiovascolare e in diverse ghiandole secretorie (Joosten, 1988a); inoltre, essa è in grado di sollecitare la muscolatura liscia dell'utero, dell'intestino e del tratto respiratorio, di stimolare la produzione di adrenalina e noradrenalina dalla ghiandola surrenale, di influenzare la secrezione acido-gastrica. I suoi effetti, quindi, sono molteplici e possono includere eruzioni cutanee, orticaria, infiammazioni locali e edema; sintomi gastrointestinali riguardano nausea, vomito, diarrea e dolori addominali; possono presentarsi anche palpitazioni, mal di testa, ipotensione, formicolio, arrossamenti, broncospasmi, difficoltà respiratorie. Esiste, nel tratto intestinale, un sistema di detossificazione per l'istamina ingerita con gli alimenti e formata dalla flora intestinale. Questo sistema comprende tre enzimi che trasformano l'istamina in prodotti non tossici: la monoammina ossidasi (MAO), la diammina ossidasi (DAO) e l'istamina-N-metil transferasi (HMT) (Silla Santos, 1996). L'azione detossificante di questi enzimi può essere inibita in diversi casi: in soggetti allergici, quando la concentrazione di istamina è troppo elevata e in presenza di inibitori enzimatici. Anche la presenza di altre ammine biogene può influenzare la tossicità dell'istamina: ad esempio, la putrescina e la cadaverina sono definite "potenziatori" di tossicità. La tiramina inibisce l'attività della monoammina ossidasi, la triptamina inibisce la diammina ossidasi e fenilettilammina l'istamina-N-metiltransferasi. Inoltre, la spermina e la spermidina aumentano il trasporto di istamina attraverso la parete gastrointestinale e certi farmaci possono influenzare l'attività del sistema detossificante, come alcuni antistaminici e farmaci antimalarici.

Anche la tiramina può avere effetti tossici sull'organismo, in quanto può reagire con alcuni farmaci inibitori della monoammina ossidasi (MAOI) portando a crisi ipertensive (Marine-Font, 1978). Essa agisce principalmente indirettamente favorendo il rilascio di noradrenalina dal sistema nervoso simpatico portando a un aumento della pressione sanguigna. Inoltre, essa causa lacrimazione, dilatazione delle pupille, salivazione e aumento della frequenza respiratoria. L'utilizzo di alcuni farmaci inibitori della monoammina ossidasi, che vengono prescritti in casi di depressioni mentali, possono provocare l'accumulo nel sangue di ammine come la tiramina e portare, quindi, a crisi ipertensive.

Queste, in casi gravi, possono sfociare in emorragie cerebrali e infarti.

La tiramina è in grado di reagire con il nitrito formando la 3-diazotiramina, che provoca l'insorgenza di cancro nella cavità orale delle cavie. Questo composto potrebbe formarsi

nello stomaco dopo incubazione di tiramina e nitrito a 37°C e pH 1,0-2,0 per circa un'ora (Joosten, 1988b). Le ammine biogene possono portare alla formazione di nitrosammine ed essere nitrosilate esse stesse; le nitrosammine sono composti cancerogeni molto pericolosi per gli animali e per l'uomo. Tracce di metilammina, dietilammina, pirrolidina e piperidina sono state rilevate in diversi cibi congelati. La putrescina e la cadaverina possono essere convertite in pirrolidina e piperidina rispettivamente ad alte temperature; da queste ultime si ottengono, nelle stesse condizioni di temperatura, la N-nitrosopirrolidina e la N-nitrosopiperidina. Processi tecnologici effettuati sugli alimenti, come la salatura e l'affumicamento, inducono la produzione di nitrosammine, mentre la cottura aumenta la loro formazione.

5.3 Microrganismi produttori di ammine biogene

Generalmente, le ammine derivano dall'attività decarbossilasica di alcuni microrganismi; le decarbossilasi sono state ritrovate in diversi generi di batteri: *Bacillus*, *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klesbiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*.

Attività decarbossilasiche per la tirosina e l'istidina sono state rilevate in ceppi di *E. coli* e *Pseudomonas* (Díaz *et al.*, 1992), mentre ceppi di *E. faecalis* sono stati correlati alla presenza di tiramina nel formaggio Cheddar (Celano *et al.*, 1992). Nel *L. bulgaricus* e *L. sanfrancisco* sono state identificate attività istamina-decarbossilasiche.

Alcuni batteri lattici sono responsabili della produzione di istamina nella carne, come *L. brevis*, *L. buchnerii*, *L. carnis*, *L. curvatus*, *L.s divergens* e *L. hilgardii* (Maijala *et al.*, 1993).

Nel formaggio diversi ceppi sono responsabili della formazione di ammine biogene. Alcuni batteri usati come colture starter nella produzione di formaggio sono in grado di formare istamina, come *S. lactis* e *L. helveticus*. Altri microrganismi che presentano attività istamina-decarbossilasiche sono *S. faecium*, *S.s mitis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. arabinose* e batteri propionici. *Enterobacteriacee*, *E. faecalis* e lattobacilli eterofermentativi sono in grado di produrre fino a 600 ppm di ammine biogene, inclusa la fenilettilammina (Nout, 1994). Inoltre, in un recente studio è stata valutata la produzione di istamina del *B. macerans* (Rodriguez-Jerez *et al.*, 1994).

Data la loro tossicità, diventa molto importante, per controllare il contenuto di ammine biogene negli alimenti, inibire l'attività decarbossilasica e prevenire la crescita batterica. La produzione di istamina nel formaggio dipende dal pH, dalla temperatura, dalla concentrazione salina, dalla disponibilità di amminoacidi liberi, ma anche dalla modalità di conservazione del prodotto. Infatti, le concentrazioni di tiramina e istamina aumentano con il tempo e la temperatura di conservazione (Díaz-Cinco *et al.*, 1992). Inoltre, la produzione di istamina viene rallentata a temperature intorno ai 10°C e termina a 5°C, a causa delle difficoltà di crescita dei batteri decarbossilasi positivi a basse temperature (Silla Santos, 1996). Tuttavia, basse temperature di conservazione non sono sufficienti per inibire la produzione di ammine biogene tossiche come l'istamina (Ababouch *et al.*, 1991). Il pH è sicuramente un fattore importante per quanto riguarda l'attività decarbossilasica; la produzione di tiramina nel formaggio avviene a

un pH ottimale intorno a 5,0 che corrisponde al valore ottimale per l'attività istidina-decarbossilasi.

5.4 Limiti di legge

Il Decreto Legislativo n.531 del 30-12-1992, attuativo della Direttiva CEE 91/493 prevede che il valore medio di istamina di nove campioni prelevati da un unico lotto non deve superare 100mg/Kg, che due unità campionarie possono avere un tenore compreso tra 100-200mg/Kg, e che nessun campione deve avere tenore superiore a 200mg/Kg. Questi limiti si applicano solo alle famiglie degli Sgombridi e Clupeidi non trattati con maturazione enzimatica in salamoia; in quest'ultimo caso i valori di istamina non devono superare il doppio di quelli precedentemente riportati.

L'esistenza di potenziatori influenza significativamente la soglia dei valori accettati di istamina negli alimenti (Taylor *et al.*, 1984). Nella determinazione dei valori limite incidono anche altri fattori, come l'assunzione di farmaci ammina-ossidasi inibitori, alcool e malattie gastrointestinali. In generale, si può affermare che 8-40mg di istamina possono causare una leggera intossicazione, mentre quantitativi maggiori di 40mg una moderata intossicazione e livelli superiori a 100mg una grave intossicazione; valori superiori a 100mg di tiramina possono provocare emicrania, mentre 1080 mg potrebbero causare effetti tossici di gonfiore (Askar e Terptow, 1986). Per quanto riguarda il contenuto di istamina nel pesce, concentrazioni inferiori ai 5mg/100g sono accettabili per un consumo sicuro, 5-20mg/100g potrebbero causare un'intossicazione, così come concentrazioni di 20-100mg/100g di prodotto, mentre consumi di concentrazioni superiori ai 100mg/100g sono considerati pericolosi per la salute del consumatore. Per quanto riguarda la farina, il consumo di ammine biogene in quantità superiori a 40mg è considerato potenzialmente tossico (Ayres *et al.*, 1980). Comunque non tutte le ammine sono ugualmente tossiche e livelli di 50-100ppm, 100-800ppm e 30ppm per istamina, tiramina e feniletilammina rispettivamente, o un totale di 100-200ppm, sono considerati accettabili. Per il pesce e alimenti a base di pesce, la somma di putrescina, cadaverina e istamina viene limitata a 300mg/Kg, mentre per i crauti fermentati sono stati proposti i seguenti limiti: tiramina, 20mg/Kg; istamina, 10mg/Kg; feniletilammina, 5mg/Kg; cadaverina, 25mg/Kg; putrescina, 50mg/Kg (Kuensch *et al.*, 1989).

CAPITOLO 6

CARATTERIZZAZIONE DEI BATTERI LATTICI

La tassonomia consente di identificare, descrivere e classificare i microrganismi. La classificazione comprende diversi livelli gerarchici, per i batteri il livello superiore è la classificazione tra i procarioti e il livello più basso è la specie. Mentre la tassonomia basata sull'analisi del fenotipo include lo studio dei caratteri morfologici, fisiologici e biochimici, la tassonomia a livello molecolare classifica i batteri attraverso la valutazione del grado di similarità tra i loro genomi o particolari tratti di questi. I metodi molecolari più utilizzati si basano sulla determinazione del contenuto in guanina e citosina del DNA, sulla ibridazione DNA-DNA e sulla sequenza dei geni ribosomali. Benché sia molto difficile impiegare metodiche fenotipiche e genotipiche insieme per la classificazione dei microrganismi (spesso infatti una caratterizzazione basata unicamente sulla determinazione di caratteristiche fenotipiche non corrisponde esattamente a quella basata sul genotipo) la tassonomia moderna segue l'approccio così detto “polifasico” che considera dati fenotipici, chemotassonomici e genotipici (Schleifer, 2009). In particolare la tassonomia molecolare risulta uno strumento decisamente molto interessante perché fornisce informazioni relative anche alle relazioni filogenetiche tra i microrganismi. Le metodologie e i risultati in campo tassonomico sono stati utilizzati per la definizione di protocolli per l'identificazione e la caratterizzazione dei batteri isolati da svariate matrici ambientali e alimentari.

Per quanto riguarda la caratterizzazione fenotipica, tradizionalmente i batteri sono stati identificati in base alle loro proprietà morfologiche, biochimiche e fisiologiche o tecnologiche. Queste caratteristiche possono però variare all'interno della stessa specie in base alle condizioni di crescita, e quindi possono fornire risultati in alcuni casi poco affidabili. Più recentemente sono stati introdotti metodi molecolari che possono essere efficacemente utilizzati per l'identificazione a livello di genere, di specie e anche di ceppo. Questi metodi si basano sulle similarità di sequenza del DNA del microrganismo da identificare e il DNA di un ceppo di riferimento, e permettono diversi livelli di identificazione: ceppo, specie, genere.

I più utilizzati si basano sull'amplificazione di tratti specifici di DNA mediante PCR (reazione a catena della polimerasi) e sull'analisi del polimorfismo di restrizione (RFLP) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2007) generato utilizzando svariate endonucleasi di restrizione che tagliano il DNA a livello di siti specifici.

Verranno qui di seguito illustrate le più importanti tecniche fenotipiche e genotipiche per la caratterizzazione batterica a livello di specie e di ceppo con particolare riguardo alla loro applicazione in campo enologico.

6.1 Caratterizzazione fenotipica

Queste tecniche si basano sulla valutazione di proprietà fenotipiche, come lo studio della morfologia cellulare delle colonie, la valutazione della crescita su diversi substrati e la natura dei prodotti del metabolismo. Le osservazioni morfologiche effettuate a fresco o su preparati fissati, riguardano ad esempio la forma della cellula che può essere a cocco, bastoncello, il tipo di aggregazione cellulare quali a coppie, tetradie o catenelle. Anche la colorazione di Gram è di grande importanza per la caratterizzazione dei microrganismi poiché permette una valutazione, seppur grossolana, della composizione della parete cellulare batterica.

A livello metabolico riveste fondamentale importanza la distinzione tra omofermentanti e eterofermentanti, in relazione alla trasformazione del glucosio, e la determinazione della natura ottica dell'acido lattico prodotto dalla fermentazione del glucosio (alcune specie infatti formano solo acido L-lattico altre acido D-lattico, oppure entrambe). Tutte queste rilevazioni permettono una identificazione a livello di genere, mentre per raggiungere la determinazione della specie è necessario analizzare il profilo fermentativo di una serie complessa di carboidrati (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda la caratterizzazione a livello di ceppo vengono considerate altri aspetti metabolici che permettono una distinzione più fine di individui appartenenti alla stessa specie. Ad esempio in ambito enologico si valutano delle caratteristiche tecnologiche che possano avere un peso sulla qualità e sulla salubrità del vino, ad esempio la produzione di metaboliti secondari che influenzano le proprietà organolettiche quali glicerolo, acetato, esopolisaccaridi o quelli derivati dal metabolismo dei pentosi oppure viene preso in considerazione il rilascio di sostanze tossiche come le amine biogene (Maria Saguir *et al.*, 2009). Altri criteri vengono poi utilizzati nel caso in cui la caratterizzazione abbia lo scopo di selezionare colture starter per innescare fermentazione malolattica controllata. In particolare si valutano in questo caso la capacità di concludere rapidamente la trasformazione dell'acido malico, la capacità di tollerare pH bassi, etanolo e anidride solforosa, l'azione positiva sulle qualità sensoriali del vino e l'idoneità all'utilizzo industriale (Vincenzini *et al.*, 2005)

6.2 Caratterizzazione biomolecolare

La caratterizzazione microbiologica dei microrganismi è uno degli step più complessi ma allo stesso tempo indispensabile, per un corretto utilizzo di forme microbiche come starter nei processi tecnologici dell'industria alimentare (Catteddu *et al.*, 2006).

Identificare un microrganismo significa assegnarlo ad un determinato genere e specie. L'identificazione fenotipica si basa sulla definizione delle caratteristiche fisiologiche che un microrganismo manifesta e di conseguenza su una serie di test di tipo fisiologico e biochimico, che però in alcuni casi non garantiscono la sicurezza di una corretta identificazione, infatti una coltura batterica saggiata in due momenti differenti può produrre risultati diversi. Questo problema ha portato a un utilizzo sempre più frequente di metodi di identificazione basati su metodiche di biologia molecolare le quali considerano delle caratteristiche stabili non influenzate da parametri estrinseci. Infatti i due target utilizzati a fine identificativo sono il DNA e le proteine, analizzando la

molecola di DNA o meglio la sua sequenza nucleotidica è possibile ottenere l'identificazione del microrganismo in esame. Le metodiche principalmente utilizzate sono quelle che si basano sul sequenziamento dei geni codificanti le subunità ribosomiali nello specifico i geni che codificano per la subunità 16S rRNA dei batteri, poiché questi geni rappresentano dei target ideali per l'identificazione in quanto sono altamente conservati all'interno di una stessa specie mentre presentano differenze tra specie diverse. Le sequenze da analizzare in laboratorio sono ottenute solitamente mediante l'utilizzo della PCR. Nella microbiologia degli alimenti le metodiche più diffuse che utilizzano la PCR come metodo analitico sono rappresentate dalla RAPD-PCR metodica coltura dipendente, e la PCR-DGGE tecnica coltura indipendente cioè invece di procedere all'isolamento utilizzando opportuni terreni di coltura e alla purificazione del microrganismo si procederà direttamente all'estrazione del DNA o RNA microbico dall'ambiente di studio ciò è molto importante proprio per studiare o meglio monitorare popolazioni microbiche all'interno degli alimenti.

I metodi di identificazione genotipica si basano sull'analisi del DNA e permettono sia di distinguere microrganismi appartenenti a specie diverse (caratterizzazione a livello di specie) sia di analizzare la variabilità intraspecifica dei ceppi appartenenti a una stessa specie o popolazione (biotipizzazione a livello di ceppo). In particolare molti di questi sistemi di identificazione si basano sull'analisi dell' rRNA 16S che è stato dimostrato essere uno strumento tassonomico di fondamentale importanza per la classificazione batterica in quanto ha rivelato l'inesatta organizzazione di molti taxa creati sulla base di caratteristiche fenotipiche e ha portato a delineare nuove relazioni filogenetiche per moltissime specie batteriche (Mohania *et al.*, 2008).

Di seguito verranno descritti i più importanti e moderni metodi di identificazione e caratterizzazione genotipica dei batteri. Poiché nella maggior parte dei casi queste metodiche possono essere applicate sia alla caratterizzazione a livello di specie che a quella a livello di ceppo, non sono stati suddivisi a seconda dell'applicazione.

6.2.1 16S-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (16S-ARDRA)

Il metodo si basa sull'amplificazione della regione 16S del DNA ribosomale e successiva digestione enzimatica del tratto con endonucleasi di restrizione ed è in grado di evidenziare il polimorfismo di sequenza che è associato alla specie batterica. Infatti, la regione 16S del rDNA è un orologio molecolare che incorpora mutazioni in modo lento per cui è altamente conservata all'interno di una specie. Il profilo costituito dai frammenti di restrizione viene confrontato con quelli di specie note per ottenere l'identificazione dei campioni in esame.

L'ARDRA si è dimostrata un potente strumento per la identificazione di lattobacilli isolati da campioni di varia origine tra cui anche quelli enologici (Rodas *et al.*, 2003). Questa tecnica presenta numerosi vantaggi come la ripetibilità e la semplicità dell'interpretazione dei dati e dell'esecuzione, qualità che ne hanno favorito l'utilizzo per l'identificazione a livello di specie (Rodas *et al.*, 2005). Il maggiore grado di risoluzione si ottiene naturalmente con l'impiego di diversi enzimi di restrizione, ad

esempio per la discriminazione di batteri lattici enologici, l'utilizzo di 3 enzimi ha permesso la discriminazione del maggior numero di specie; ma per uno screening preliminare l'enzima *MseI* permette il riconoscimento della maggior parte delle specie di rilevanza enologica (Rodas *et al.*, 2003).

6.2.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Con questa tecnica si utilizzano endonucleasi di restrizione per tagliare il DNA genomico generando dei pattern che evidenziano il grado di polimorfismo di sequenza esistente tra i diversi ceppi. Infatti alcune regioni genomiche alleliche spesso differiscono per sostituzioni di singole coppie di basi, delezioni, inserzioni o riarrangiamenti che alterano il sito di taglio riconosciuto dall'enzima, o fanno variare la distanza che separa due siti specifici per l'endonucleasi.

La RFLP può essere considerata una delle prime tecniche di identificazione batterica a livello di specie basata sul DNA, che ha poi subito delle modificazioni dando luogo ad altre più innovative metodiche come il ribotyping, l'AFLP e l'ARDRA (Ben Amor *et al.*, 2007) .

Gli svantaggi della RFLP sono identificati in una complessità di esecuzione perché è necessario un DNA integro e di elevata purezza, e in un tempo più lungo per l'esecuzione dell'analisi dovuto alla necessità di un passaggio di estrazione del DNA. Una variante di questa tecnica può essere considerata l'ARDRA che combina alla restrizione enzimatica l'amplificazione del DNA, bypassando le difficoltà della RFLP. Originariamente per la sistematica vegetale ma è risultata molto utile anche in microbiologia sia per la tipizzazione che per la distinzione a livello di specie. Si tratta infatti di una metodica molto ripetibile e ad alto potere risolutivo ma presenta anche degli svantaggi soprattutto in termini di maggior complessità e maggiori costi rispetto ad esempio all'ARDRA (Mohania *et al.*, 2008).

Con questa metodica è stato possibile distinguere le specie appartenenti al *L. plantarum* group e in alcuni casi si è anche pervenuto alla tipizzazione dei ceppi della specie *L. plantarum* (Torriani *et al.*, 2001) con un'alta risoluzione e specificità.

6.2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere amplificata esponenzialmente *in vitro*, quindi simula *in vitro* ciò che avviene realmente *in vivo*, cioè il processo naturale della duplicazione del DNA. Si basa sulla reazione a catena di una polimerasi nota come *Taq* DNA polimerasi, ottenuta da un microrganismo termofilo (*Thermus aquaticus*) che consente di sintetizzare *in vitro* molteplici copie di DNA o RNA. Durante la fase di amplificazione vengono infatti utilizzati primer che aderiscono al DNA (fase di *annealing*), fungendo da innesco per la DNA polimerasi. I due primer utilizzati per la PCR sono definiti *reverse* e *forward*, a seconda che siano complementari al filamento 5'→3' o a quello inverso 3'→5'. La PCR può essere usata anche per modificare la sequenza amplificata o per aggiungere una nuova informazione

di sequenza. Essa ci permette di poter scegliere come primer diverse sequenze di DNA, infatti viene utilizzata in vari campi come la clonazione e il sequenziamento per la valutazione tassonomica di molte specie microbiche. La PCR è una tecnica che può risultare utile per ottenere più copie di sequenze specifiche di DNA tassonomicamente significative in modo da poterne determinare la struttura e risalire quindi sulla base di banche-dati genetiche alla specie di appartenenza, così come può essere d’ausilio per discriminare su basi genotipiche ceppi o biotipi nell’ambito della stessa specie.

L’amplificazione del gene che codifica per il 16S rRNA, e la successiva analisi di sequenza è uno dei metodi più utilizzati per l’identificazione dei batteri. Il DNA genomico è direttamente estratto dalle colture batteriche e il gene 16S rRNA è amplificato utilizzando specifici primer tramite PCR. Il gene amplificato è poi sequenziato utilizzando un sequenziatore automatico e la sequenza viene analizzata con metodi bioinformatici per ricercare polimorfismi con le sequenze del 16S note di altre specie microbiche.

6.2.4 rep-PCR (Repetitive PCR)

Questa tecnica si basa sull’amplificazione di regioni DNA con primer costituiti da una serie ripetuta di nucleotidi che riconoscono sequenze omologhe nel DNA. I frammenti di amplificazione vengono separati su gel di agarosio ottenendo profili di amplificazione tipici di ogni ceppo.

Gli elementi ripetuti sono delle corte sequenze di un numero variabile da 5 a poche decine di nucleotidi che si trovano disperse nel genoma batterico e ripetute in tandem in molteplici copie. La maggior parte di questi elementi sono stati originariamente identificati in *E. coli*, successivamente ne è stata dimostrata la presenza in numerosissime altre specie batteriche, fino a giungere alla convinzione che siano universalmente presenti tra i batteri (Versalovic *et al.*, 1991; Lupski *et al.*, 1992). Diversi sono i primer utilizzati, che sono stati costruiti per amplificare differenti elementi ripetuti come il REP, BOX, ERIC, (GTG)₅. Gli elementi REP (Repetitive Extragenic Palindromic) sono delle sequenze che si trovano all’interno di regioni non codificanti e hanno una struttura palindromica e formano delle anse nell’RNA, una volta che il DNA viene trascritto. Per l’alto livello di conservazione della struttura tridimensionale del loro RNA, è stata ipotizzata una funzione regolatrice ad esempio della trascrizione dell’RNA stesso. Gli elementi ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sono delle sequenze ripetute individuate per la prima volta in *E. coli*, contengono un dominio centrale altamente conservato e sono localizzati in regioni extrageniche. BOX invece sono delle sequenze presenti in tre diverse sub unità di differente lunghezza, rappresentano il primo elemento ripetuto individuato nel genoma dei batteri Gram positivi. Di diversa natura è l’elemento (GTG)₅ che consiste in un trinucleotide presente in numerose copie nel genoma di diverse specie batteriche, diversamente dagli elementi descritti precedentemente, questo non è codificante ed è normalmente altamente ripetuto (Versalovic *et al.*, 1991). Grazie alla vasta distribuzione degli elementi ripetuti nei genomi batterici e alla loro specificità, è stata proposta già molti anni fa l’utilizzo di questi elementi come base per la costruzione di primer da

utilizzare in tecniche di la caratterizzazione batterica (Lupski *et al.*, 1992). Il metodo sviluppato produce risultati ripetibili e si dimostra decisamente affidabile, ma richiede una accurata estrazione del DNA che deve essere integro e di purezza sufficiente per una efficace amplificazione, per cui i tempi di analisi sono maggiori rispetto ad altri metodi che possono utilizzare estratti crudi di acidi nucleici (Versalovic *et al.*, 1994; Gevers *et al.*, 2001). La tecnica nota come rep-PCR è stata utilizzata per la caratterizzazione di molti batteri sia Gram positivi che Gram negativi tra cui il gruppo delle *Enterobacteriaceae*, alcuni microrganismi del genere *Rhizobium* e *Azorhizobium* (Versalovic *et al.*, 1994), batteri appartenenti al genere *Lactobacillus* (Gevers *et al.*, 2001) e batteri acetici (De Vuyst *et al.*, 2008). In particolare il primer (GTG)₅ si è dimostrato un potente mezzo per la differenziazione di un ampia gamma di batteri sia al livello di specie che di ceppo, grazie alla sua caratteristica di elemento altamente ripetuto e conservato e alla sua ampia diffusione nei genomi batterici (Papalexandratou *et al.*, 2009), è stata infatti proposta questa tecnica come una affidabile alternativa agli altri metodi di identificazione classicamente utilizzati (Gevers *et al.*, 2001), quali RAPD e AFLP. In confronto ad altri primer basati su sequenze ripetute, come BOX, ERIC e REP, (GTG)₅ permette di ottenere profili con maggiore complessità e quindi con il maggior livello di discriminazione (Gevers *et al.*, 2001). Il primer (GTG)₅ è stato utilizzato spesso con successo in studi di caratterizzazione di specie di batteri lattici isolati da materiale fermentato come ad esempio la manioca fermentata usata nella produzione di un tradizionale cibo africano le salsicce e diversi tipi di salumi (Gevers *et al.*, 2003). Inoltre è stato impiegato per la caratterizzazione di batteri acetici isolati dai semi di cacao fermentati (Camu *et al.*, 2007), per i quali risulta ad oggi il miglior sistema di identificazione (Papalexandratou *et al.*, 2009). Questa tecnica si è anche rivelata un potente strumento per discriminare isolati appartenenti alla stessa specie ed è stata applicata con successo alla tipizzazione di ceppi di *E. coli* fecali, di *Salmonella enterica* di *L. plantarum* e *Pediococcus* sp. isolati dalla fermentazione dei semi di cacao in Nigeria.

6.2.5 RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA)

Questo metodo è basato sull'amplificazione di regioni di DNA di sequenza incognita mediante l'uso di primer con sequenza casuale. Nel protocollo termico vengono usate temperature di appaiamento molto basse in modo tale che il primer scelto si leghi alla sequenza di DNA anche quando quest'ultima non è complementare al 100 %. In seguito a elettroforesi su gel di agarosio gli amplificati determinano dei profili con un elevato grado di conservazione per ogni gruppo tassonomico ottenendo una caratterizzazione ceppo-specifica.

Questa tecnica è molto utilizzata, in quanto ha bassi costi ed è semplice da applicare tuttavia ha lo svantaggio di essere scarsamente riproducibile, infatti numerosi fattori influenzano la ripetibilità come la purezza e la concentrazione del DNA, la combinazione di primers (Ben Amor *et al.*, 2007).

La RAPD viene correntemente impiegata per la caratterizzazione di molti batteri lattici (Andrighetto *et al.*, 2004) e ad esempio nella identificazione di ceppi probiotici, nello studio di popolazioni batteriche naturali isolate da varie matrici soprattutto di tipo lattiero caseario (Mohania *et al.*, 2008).

Numerose sono le applicazioni di questa tecnica a batteri lattici enologici sia per la caratterizzazione a livello di specie come nel caso di batteri lattici isolati dal vino (Rodas *et al.*, 2005) sia per la tipizzazione ad esempio dei ceppi di *L.plantarum* isolati dal vino e correlati alla produzione di amine biogene (Spano *et al.*, 2006) e dei ceppi di *O.oeni* in relazione alla fermentazione malolattica in vini rossi (Reguant *et al.*, 2003).

Infine un'altra applicazione interessante di questa tecnica è quella descritta da Torriani *et al.*, (2001): gli autori hanno messo a punto una combinazione di primers RAPD che insieme all'analisi AFLP permettono la distinzione tra specie

Un importante applicazione della PCR risultata adatta a discriminare ceppi o biotipi nell'ambito della stessa specie è la RAPD-PCR (Williams *et al.*, 1990). Si basa sull'impiego di singoli e piccoli primers utilizzati per amplificare porzioni casuali di DNA attraverso la PCR. Ogni primer è costituito da un basso numero di nucleotidi non a sequenza specifica ma casuale, infatti siccome la reazione di amplificazione è effettuata a bassa stringenza (specificità) ciò dà la possibilità ai primers di appaiarsi anche a sequenze di DNA non esattamente complementari, innescando così una reazione di amplificazione in più punti del DNA bersaglio, ottenendo così un profilo di più bande e non un'unica banda specifica. In questo modo si ha un differente “fingerprinting” genetico altamente specifico per un dato microrganismo. I risultati possono poi essere comparati tra i campioni per calcolare la percentuale di similarità.

Tale tecnica consente una biotipizzazione a livello di ceppo nell'ambito della stessa specie e nel monitorare la dinamica di una popolazione in alimenti fermentati (Cocconcilli *et al.*, 1995). I vantaggi offerti da tale tecnica sono i seguenti: risulta *culture-independent*, rapida, di facile applicazione e non richiede una conoscenza specifica del genoma da amplificare.

6.2.6 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La DGGE è una delle tecniche più precise per l'identificazione a livello di specie all'interno di una comunità batterica. Abbinata alla PCR, definita PCR-DGGE, essa è in grado di separare i prodotti derivanti dall'amplificazione mediante PCR su un gel di poliacrilammide a gradiente denaturante. La tecnica sfrutta il principio che la temperatura di denaturazione del DNA (T_m) dipende dalla sua sequenza nucleotidica ed è peculiare ad ogni frammento, quindi variazioni di un singolo nucleotide modifica la temperatura di denaturazione del frammento e la sua mobilità. La variazione della T_m del frammento di DNA può essere controllata sul gel di poliacrilammide a concentrazione di denaturante crescente, infatti al raggiungimento della temperatura di denaturazione, cioè concentrazione di denaturante ad essa equivalente, si ha una parziale apertura della doppia elica e quindi un rallentamento nella progressione del frammento su gel. I frammenti di DNA con sequenze diverse di nucleotidi si denaturano in maniera differente in presenza del gradiente di denaturante chimico e quindi essere

separati in bande distinte durante la corsa elettroforetica, separati in base alla loro diminuita mobilità lungo il gel in base al loro grado di denaturazione quindi di conseguenza la diversità di una comunità microbica può essere visualizzata in termine di sequenze di bande. Per evitare la denaturazione completa dei frammenti di DNA si aggiunge all'estremità 5' della catena del primer forward una sequenza di 30-40 bp ricche in GC.

Tale tecnica è molto utilizzata per lo studio di popolazioni microbiche, all'interno di matrici alimentari e non, di difficile isolamento ed identificazione con le metodiche tradizionali; infatti è stata applicata in molte aree di ricerca come ad esempio la caratterizzazione dei batteri lattici in alimenti fermentati quali formaggio (Coppola *et al.*, 2001), birra (Tsuchiya *et al.*, 1994) e vino (Spano *et al.*, 2006).

6.2.7 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Questo metodo permette di separare frammenti di DNA di grandi dimensioni, grazie all'applicazione di un campo elettroforetico alternato. La migrazione dei macroframmenti di DNA nel gel avviene grazie all'applicazione di campi elettrici alternati disposti negli strumenti più moderni in modo da formare un angolo di 120°. Il cambiamento di polarità determina una serie di riarrangiamenti del frammento di DNA nelle maglie di agarosio, modificazioni conformazionali che lo impegnano per un tempo inversamente proporzionale alle sue dimensioni. In questo modo ad ogni cambio di polarità i frammenti maggiori avranno un tempo di migrazione effettivo più breve e risulteranno complessivamente più lenti (Ben Amor *et al.*, 2007).

Il profilo generato rappresenta l'intero genoma del microorganismo e quindi il potere discriminatorio di questa tecnica è notevolmente superiore a molte altre tecniche descritte precedentemente.

La tecnica PFGE può essere utilizzata sia per la differenziazione di specie sia per la tipizzazione a livello di ceppo e questa ultima applicazione è particolarmente interessante dato il potere risolutivo di questa tecnica che nel caso di alcuni lattobacilli si è dimostrato maggiore rispetto alla RAPD e al ribotyping (Mohania *et al.*, 2008).

6.3 MALDI TOF/TOF

La spettrometria di massa con tecnologia MALDI TOF/TOF, *matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry* (MALDI TOF/TOF-MS) è stata recentemente introdotta nei laboratori di microbiologia come metodo rapido, accurato ed economico per l'identificazione dei batteri, micobatteri, lieviti e funghi. Questa tecnologia costituisce un'alternativa valida e interessante ai metodi di microbiologia classica e di biologia molecolare ed è applicabile in differenti aree della diagnostica clinica e della ricerca. Dal punto di vista organizzativo l'utilizzo del MALDI TOF/TOF-MS migliora notevolmente i tempi e anche le modalità di refertazione.

E' una tecnica analitica che consente di misurare in maniera estremamente accurata il peso molecolare di macromolecole di interesse biologico e di determinarne la loro identità in base al rapporto massa/carica (Clark *et al.*, 2013).

La tecnica prevede che un campione batterico proveniente da una brodocoltura o da una singola colonia, possa essere analizzato ottenendo in qualche minuto uno spettro di massa i cui segnali sono originati da componenti proteiche ribosomiali o loro frammenti rilasciate in seguito a lisi della parete batterica. (metodo diretto). In caso di identificazione di batteri patogeni, alcune forme batteriche, miceti lieviti formi/filamentosi si esegue prima dell'analisi un'estrazione con acido formico o acido trifluoroacetico al fine di aumentare l'efficienza dell'estrazione delle proteine batteriche non facilmente disponibili per l'analisi (Ferreira *et al.*, 2009).

Il campione viene trattato con una matrice realizzata in materiali organici (acido α -ciano-4-idrossicinnamico), necessaria perché in grado di fungere da fonte di protoni necessari alla ionizzazione dell'analita in esame, dopodiché viene bombardato in più punti da un fascio laser pulsato il quale permette di disgregare il campione in numerosi frammenti con carica positiva (cationi monovalenti) costituiti ognuno da porzioni oligopeptidiche associate a porzioni di matrice organica.

Una volta vaporizzati (desorbimento) i frammenti vengono accelerati da un campo elettromagnetico adiacente e migrano in senso lineare attraverso il cosiddetto “tubo di volo” per raggiungere e colpire una membrana che rileverà e registrerà la massa ionizzata in tempi differenti in base alla massa degli ioni.

Mediante il rilevatore di ioni, gli ioni impattanti su di esso vengono misurati nel loro rapporto massa/carica (m/z) potendo così risalire al peso molecolare della molecola analizzata. Lo strumento è collegato a un software in grado di acquisire i dati elaborarli in spettri di massa e confrontarli con spettri di riferimento presenti nel database interno; gli spettri sono acquisiti in modalità lineare positiva nell'intervallo m/z 2000-20000, in questo modo si arriva così all'identificazione batterica.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 7

SCOPO DELLA TESI

Il mercato enologico ha subito negli ultimi anni importanti cambiamenti motivati dalla sempre più attenta attenzione dei consumatori verso la qualità. Uno dei processi che influenza la qualità dei vini, consentendo di ottenere prodotti equilibrati e strutturalmente complessi, è la fermentazione malolattica. Tale processo metabolico è strettamente influenzato dalle condizioni microambientali e climatiche che spesso ne rende difficoltosi l'avvio e il normale svolgimento. Da qui nasce l'esigenza di utilizzare batteri starter che possano facilitare la gestione di questo processo. L'attività di ricerca svolta durante il corso triennale del dottorato di ricerca in “*Biotecnologia degli Alimenti*” ha riguardato, in una prima fase, l'identificazione e la caratterizzazione tecnologica di ceppi appartenenti alla specie *L. plantarum* isolati da vini rossi dell'Italia Meridionale e, in una seconda fase, la selezione di ceppi in possesso di ottime caratteristiche fisiologiche e tecnologiche al fine di utilizzarli come starter per la fermentazione malolattica nei vini.

CAPITOLO 8

MATERIALI E METODI

8.1 CAMPIONAMENTO

Sono stati campionati 23 vini rossi, prelevati da 11 cantine artigianali dislocate in diverse aree del sud Italia, che, nello specifico, comprendono le seguenti tipologie: due campioni di Aglianico, sei di Montepulciano, due di Pentro d’Isernia, tre di Piediroso, due di Rosso Molise, due di Taurasi e sei di Tintilia.

Il campionamento è stato effettuato a fine fermentazione alcolica e durante lo svolgimento della fermentazione malolattica, entrambe ad andamento spontaneo (senza inoculo di starter).

I campioni sono stati prelevati e mantenuti in contenitori sterili a 4°C, per essere trasportati presso il laboratorio di enologia del dipartimento A.A.A, dove sono state effettuate le analisi chimico-fisiche e microbiologiche.

Nella tabella 2 sono riportate le sigle, la tipologia e la provenienza dei 23 campioni di vino prelevati.

Tabella 2 Campioni di vino

Campioni	Tipologia	Regione
AGA	Aglianico	Campania
AGB	Aglianico	Campania
MTA	Montepulciano	Molise
MTB	Montepulciano	Molise
MTG	Montepulciano	Molise
MTC	Montepulciano	Molise
MTD	Montepulciano	Molise
MTE	Montepulciano	Molise
PIN	Pentro d’Isernia	Molise
PID	Pentro d’Isernia	Molise
PDA	Piediroso	Campania
PDS	Piediroso	Campania
PDL	Piediroso	Campania
RMC	Rosso Molise	Molise
RMD	Rosso Molise	Molise
TAB	Taurasi	Campania
TAS	Taurasi	Campania
TSB	Tintilia	Molise
TSD	Tintilia	Molise
TSE	Tintilia	Molise
TSG	Tintilia	Molise
PIL1	Tintilia	Molise
PIL3	Tintilia	Molise

8.2 ANALISI CHIMICO-FISICHE

Sui campioni di vino sono state eseguite le analisi chimico-fisiche secondo le metodiche riportate in Gazzetta ufficiale della Comunità Europea, Regolamento (CE) N. 761/1999.

8.2.1 Determinazione del pH

La determinazione del pH è stata eseguita per via potenziometrica, mediante l'utilizzo di un pHmetro Crison basic.

8.2.2 Determinazione dell'acidità totale

La determinazione dell'acidità totale è stata effettuata mediante titolazione potenziometrica utilizzando un pHmetro crison basic e come titolante NaOH 0,1N, come da Regolamento (CE) N. 761/1999. I risultati sono stati espressi come g/L di acido tartarico.

8.2.3 Determinazione del grado alcolico

La determinazione del grado alcolico è stata effettuata utilizzando un distillatore elettronico enochimico (Gibertini) e la densità del distillato è stata misurata mediante l'utilizzo di un densimetro DE40 Density Meter (Mettler Toledo) . La normativa vigente prevede la possibilità di utilizzare qualunque modello di apparecchio di distillazione a condizione che esso soddisfi il seguente saggio: distillare 5 volte di seguito una miscela idroalcolica al 10% in volume. Dopo l'ultima distillazione , il distillato deve presentare un titolo alcolometrico di almeno 9,9% in volume. I risultati sono stati espressi in % di alcol (v/v).

8.2.4 Determinazione dell'acido L-malico

La determinazione dell'acido malico è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit enzimatico (Steroglass, Italy).

L'acido L-malico viene ossidato ad ossalacetato dal NAD in presenza dell'enzima L-malato deidrogenasi (L-MDH) con formazione di NADH. L'enzima glutamato-ossalacetato deidrogenasi (GOT) in presenza di L-glutamato sottrae l'ossalacetato dall'ambiente di reazione catalizza la sua trasformazione in L-aspartato con formazione di 2-ossoglutarato. Il NADH che si forma è in concentrazione stechiometrica con il L-malato e l'aumento del NADH è misurabile per via spettrofotometrica a 340nm.

Il valore ottenuto è stato espresso in g/L di acido L-malico.

8.2.5 Determinazione dell'acido L-lattico

La determinazione dell'acido L-lattico è stata effettuata anch'essa mediante l'utilizzo di un kit enzimatico (Steroglass, Italy).

L'acido L-lattico è ossidato a piruvato dal NAD in presenza dell'enzima L-lattato deidrogenasi (L-LDH) con formazione di NADH. Il NADH che si forma è in concentrazione stechiometrica con il L-lattato e l'aumento del NADH è misurabile per via spettrofotometrica a 340nm.

Il valore ottenuto è stato espresso in g/L di acido L-lattico.

8.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Aliquote di 1mL di vino sono state sospese in 9mL di soluzione fisiologica sterile (0,9% NaCl). Un mL delle sospensioni è stato utilizzato per allestire le diluizioni decimali seriali in soluzione fisiologica sterile seguito da semina in piastra per inclusione utilizzando un opportuno terreno di coltura.

Come substrato di crescita è stato utilizzato MRS agarizzato con aggiunta di 40mg/L di actidione (antibiotico che inibisce lo sviluppo dei lieviti), la cui composizione è riportata in tabella 3.

Tabella 3 Composizione MRS agar

peptone	10g/L
estratto di carne	8g/L
estratto di lievito	4g/L
glucosio	20g/L
tween 80	1ml/L
potassio fosfato monoacido	2g/L
sodio acetato 3H ₂ O	5g/L
triammonio citrato	2g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2g/L
MnSO ₄ 4H ₂ O	0,05g/L
agar	20g/L

Dalle piastre a diluizione più elevata, sono stati isolati in modo casuale 8 colonie successivamente purificate per striscio superficiale sempre su terreno MRS agar (Oxoid).

8.4 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

Sono riportate di seguito le analisi condotte sugli isolati al fine di giungere alla identificazione della specie di appartenenza.

8.4.1 Osservazione al microscopio ottico

Gli isolati purificati sono stati osservati al microscopio ottico a contrasto di fase (ZEISS Aixophot) allo scopo di valutarne la morfologia e il tipo di organizzazione cellulare.

8.4.2 Colorazione di Gram

La colorazione di Gram è stata eseguita su colture batteriche overnight dopo opportuna fissazione delle stesse su un vetrino portaoggetti e mediante l'ausilio del Grams stain kit (Oxoid, Mcc), in modo da poter distinguere i batteri Gram + dai Gram -.

8.4.3 Saggio della catalasi

La coltura batterica è stata messa a contatto con una goccia di perossido d'idrogeno al 10% (v/v) allo scopo di valutare se sono batteri catalasi - o catalasi + ; in questo caso la catalasi decompone il perossido d'idrogeno in ossigeno ed acqua mostrando quindi lo sviluppo di bollicine di ossigeno.

8.4.4 Studio del profilo assimilativo delle fonti di carbonio

Lo studio del profilo assimilativo delle fonti di carbonio è stato eseguito mediante l'impiego del kit API 50 CHL (Biomerieux), costituito dalle gallerie API e dal substrato di crescita API 50 CHL medium, la cui composizione è riportata nella tabella 4. I risultati sono stati ottenuti mediante l'impiego del software APILAB. Le gallerie sono costituite da 50 pozzetti di cui 49 contenenti fonti di carbonio più uno che costituisce il controllo.

Il terreno API 50 CHL medium presente nel kit è finalizzato all'identificazione del genere *Lactobacillus* e generi affini.

Il microrganismo in esame è messo in sospensione nel terreno ed in seguito viene inoculato in ogni pozzetto della galleria.

Durante l'incubazione il catabolismo dei glucidi produce acidi organici che fanno virare l'indicatore di pH presente nel terreno.

I risultati ottenuti costituiscono il profilo biochimico del ceppo e sono utilizzati per la sua identificazione mediante analisi tramite il software APILAB.

Tabella 4 Composizione API 50 CHL medium

polipeptone	10g/L
estratto di lievito	5g/L
tween 80	1ml/L
fosfato dipotassico	2g/L
acetato di sodio 3H ₂ O	5g/L
citrato diammonico	2g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20g/L
MnSO ₄ 4H ₂ O	0,05g/L
bromocresol porpora	0,17g/L

8.5 IDENTIFICAZIONE GENETICA

8.5.1 Analisi PCR-DGGE

L'identificazione genetica è di peculiare importanza perché permette di giungere ad una chiara e certa identificazione a livello di specie.

Si è proceduto ad una preliminare estrazione del DNA dalle cellule microbiche seguito da una successiva amplificazione della regione V1 del 16S rRNA ed infine ad analisi DGGE e sequenziamento.

Nelle prove genetiche condotte è stato utilizzato, a scopo comparativo, un type strain di *L. plantarum*, il ceppo **DSM 20174**, appartenente alla collezione DSMZ (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1 b D-38124 Braunschweig-Germany).

8.5.2 Estrazione ed amplificazione del DNA batterico

Per l'estrazione del DNA sono state utilizzate colture batteriche overnight cresciute in MRS broth a 30°C.

Il protocollo usato è stato quello descritto da Querol *et al.*, (1992), modificato in alcuni passaggi. Per la digestione della parete cellulare batterica è stato utilizzato lisozima (25 mg/mL) e mutanolisina (10U/mL).

La quantificazione del DNA è stata eseguita mediante misure della densità ottica a lunghezza d'onda di 260 e 280nm, come descritto da Sambrook *et al.*, (1989), valutando la concentrazione e la purezza del DNA estratto. I primer utilizzati per l'amplificazione sono riportati nella tabella 5

Tabella 5 Primer per PCR-DGGE

primer	sequenza
P1V1GC	5' CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCTCCCGCC GCCCCGCCCCGCGCGGTGCCTAATACATGC 3' (Cocolin <i>et al.</i> , 2001)
P2V1	5' TTCCCCACGCGTTACTCAGC 3' (Rantsiou <i>et al.</i> , 2005)

Al primer P1V1 è attaccato una coda GC (CGC CCG CCG GCG CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G) (Sheffield *et al.*, 1989).

Per l’amplificazione del DNA è stato utilizzato un mix base, la cui composizione è riportata in tabella 6. Preparato e porzionato il mix, si è proceduto a caricare 2µL (circa 200ng) di DNA diluito per strip.

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) usando il ciclo di amplificazione riportato nella tabella 7.

Tabella 6 Mix amplificazione PCR

buffer	10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂	
MgCl ₂	1,5 mM	
dNTPS	0,2 mM	
primer P1V1GC	0,2 µM	
primer P2V1	0,2 µM	
taq	1,25 UI	

Tabella 7 Ciclo amplificazione

denaturazione iniziale	95°Cx5min	
denaturazione	95°Cx1min	
annealing	45°Cx1min	35 cicli
estensione	72°Cx1min	
estensione finale	72°Cx7min	

8.5.3 Analisi DGGE

Gli amplificati ottenuti mediante amplificazione della regione V1 del 16S rRNA tramite PCR, sono stati sottoposti ad analisi DGGE (Dcode Universal Mutation Detection System, BioRad, CA, USA).

L’elettroforesi è stata eseguita su gel di poliacrilamide. Per la separazione sono stati utilizzati due gradienti di denaturante, dal 40 al 60% (100% denaturante era costituito da 7M urea più 40% formamide) crescenti nella direzione della corsa elettroforetica.

Per la preparazione del gel di poliacrilamide è stato aggiunto il Temed (15µL in 15mL di soluzione) e l’APS 0,1% (ammonioperossidissolfato 150µL in 15mL di soluzione).

Dopo la polimerizzazione del gel, i campioni sono stati caricati nei pozzetti; 20µL di DNA amplificato sono stati mescolati con 15µL di Gel loading dye (colorante di corsa), il tutto, mediante l’ausilio di puntali dotati di capillari, sono stati caricati nei pozzetti. Nel primo e nell’ultimo pozzetto sono stati caricati i ladder.

La corsa elettroforetica è stata impostata a un voltaggio costante di 120 V per 5 ore alla temperatura di 60°C, utilizzando come tampone di corsa il TAE 1X (Reale *et al.*, 2011). Terminata la corsa elettroforetica i gel sono stati immersi, per 15 min, in una soluzione di bromuro di etidio (50µg/mL) per la colorazione e, successivamente, immersi, per 15 min, in una vaschetta contenente acqua distillata per la decolorazione.

Le immagini sono state scansionate mediante l’utilizzo del GEL DOC XR system (BioRad) utilizzando il software Quantity One Analysis (BioRad) e analizzate mediante il pacchetto software GEL COMPARE II VERSIONE 2.0 (Applied Maths, Kortrijk,

Belgium). Il calcolo delle similarità nei profili delle bande è stato basato sul coefficiente di correlazione di Pearson mediante un algoritmo (Vauterin e Vauterin , 1992) ottenendo un dendrogramma dove è stato possibile valutare il grado di similarità dei vari ceppi isolati.

Al fine di arrivare all'identificazione della specie isolata, dall'analisi del dendrogramma, sono stati selezionati alcuni ceppi per il successivo sequenziamento.

I ceppi selezionati per il sequenziamento sono stati amplificati utilizzando come primer P1V1 e P4V3 che amplificano 700bp della regione V1-V3 del 16S rRNA. La sequenza dei primer è riportata nella tabella 8.

Tabella 8 Primer per sequenziamento

primer	sequenza
P1V1	5' GCGGCGTGCCTAATACATGC 3' (Cocolin <i>et al</i> , 2001b)
P4V3	5' ATCTACGCATTTACCGCTAC 3' (Klijn <i>et al</i> , 1991)

Il volume finale del mix di reazione è stato di 100µl la cui composizione è riportata in tabella 9.

Tabella 9 Composizione mix reazione per sequenziamento

buffer	10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
primer P1V1	0,2 µM
primer P4V3	0,2 µM
taq	1,25 UI

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) usando il ciclo di amplificazione riportato in tabella 10.

Tabella 10 Ciclo amplificazione per sequenziamento

denaturazione iniziale	95°Cx5min	
denaturazione	95°Cx1min	
annealing	45°Cx1min	35 cicli
estensione	72°Cx1.5min	
estensione finale	72°Cx7min	

Terminato il ciclo, i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a purificazione utilizzando un PCR purification kit (Qiagen, Italia) e successivamente spediti ad una ditta esterna per il sequenziamento (MWG Biotech, Germania). La purificazione permette di allontanare dal DNA tutti gli altri composti lasciandolo in questo modo puro.

8.6 IDENTIFICAZIONE CON TECNICHE STRUMENTALI

8.6.1 MALDI TOF/TOF

L'identificazione batterica mediante maldi TOF/TOF può essere effettuata utilizzando due metodiche:

- Metodo diretto
- Estrazione con acido formico

Metodo diretto

Il metodo diretto consiste nel trasferire direttamente la colonia sulla maldi target, stemperandola mediante l'ausilio di un'ansa e cercando di distribuirla in maniera omogenea. Si lascia asciugare il campione all'aria, una volta secco, si aggiunge 1µl della matrix solution e si procede all'analisi mediante MALDI TOF/TOF.

Estrazione con acido formico

La seguente metodica prevede l'estrazione con acido formico e acetonitrile come descritto da Markelin *et al.* (2009). La procedura prevede varie fasi, di seguito riportate:

- pipettare 300µL di acqua milliQ in una eppendorf;
- trasferire una singola colonia nella eppendorf e agitare in modo da avere una sospensione cellulare omogenea;
- aggiungere 900µL di etanolo puro (freddo) e agitare per 1 min;
- centrifugare per 2 min. a 13000 rpm ed eliminare il surnatante, ripetere l'operazione due volte;
- asciugare in stufa a 60°C per eliminare l'etanolo residuo;
- preparare in una eppendorf una soluzione acquosa di ac.formico al 70% (30µL di acqua milliQ + 70µL ac.formico al 100%);
- aggiungere a seconda della grandezza della colonia da 1-10µL della soluzione di ac.formico al 70%, aggiungere lo stesso volume di acetonitrile al 100% ed agitare;
- centrifugare per 2 min a 13000rpm;
- prelevare 1µL dell'estratto e porlo sulla maldi target;
- fare asciugare all'aria;
- aggiungere 1µL della matrix solution;
- fare asciugare all'aria in modo da avere la totale cristallizzazione della matrice e procedere all'analisi mediante MALDI TOF/TOF.

La matrix solution risulta costituita da una soluzione satura di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in acetonitrile al 50% e acido trifluoroacetico al 25%.

L’analisi è stata eseguita con uno spettrometro di massa a 337nm (Autoflex; Bruker Daltonics) mediante l’utilizzo del software di controllo AUTOFLEX III (Bruker Daltonics).

La piastra utilizzata è stata una MTP 384 TARGET PLATE GROUND STEEL.

Gli spettri sono stati raccolti in modo positivo lineare entro un range di massa da 2000 a 20000Da utilizzando le impostazioni predefinite.

Lo spettrometro di massa è stato calibrato utilizzando uno standard (Bruker Daltonics).

Per l’identificazione dei ceppi batterici gli spettri ottenuti sono stati comparati con gli spettri di riferimento in un database (software 3.0 maldi Biotyper), utilizzando i valori di punteggio che variano da 0 (nessuna similitudine) a 3 (identità assoluta).

I valori di score > 2.0 sono classificati come identificazione a livello di specie sulla base delle indicazioni del software Biotyper 3.0 RTC (Real Time Classification).

8.7 BIOTIPIZZAZIONE DEI BATTERI

8.7.1 Analisi RAPD-PCR

La fase successiva di questo lavoro ha previsto l’utilizzo della RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction) allo scopo di valutare differenze intraspecifiche tra i ceppi di *L. plantarum* isolati.

Nella tabella 11 sono riportati i due primer utilizzati per la RAPD-PCR, come riportato da Andrighetto *et al.*, (2001), nello specifico: M13 e D8635.

Per l’amplificazione del DNA è stato utilizzato un mix base la cui composizione è riportata nella tabella 12 e tabella 13.

Tabella 11 Primer per RAPD-PCR

primer	sequenza
M13	5' GAGGGTGGCGTTCT 3' (Huey and Hall, 1989)
D8635	5' GAGCGCCAAAGGGAGCAGAC 3' (Akopyanz <i>et al.</i> , 1992)

Tabella 12 Mix amplificazione con primer D8635

buffer	10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
primer D8635	1 µM
taq	1,25 UI

Tabella 13 Mix amplificazione con primer M13

buffer	10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
primer M13	1 μM
taq	1,25 UI

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) usando i cicli di amplificazione riportati nella tabella 14 e tabella 15.

Tabella 14 Ciclo amplificazione con primer M13

denaturazione iniziale	94°Cx5min	
denaturazione	94°Cx1min	
annealing	42°Cx20sec	35 cicli
estensione	ramp72°Ca 0.5°C/sec	
estensione finale	72°Cx2min	

Tabella 15 Ciclo amplificazione con primer D8635

denaturazione iniziale	94°Cx2min	
denaturazione	94°Cx1min	
annealing	42°Cx1min	35 cicli
estensione	72°Cx1min30sec	
estensione finale	72°Cx10min	

Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato un gel di agarosio al 1,5% (Sigma –Aldrich, Steinheim, Germany). I pozzetti sono stati caricati con un mix costituito da 2μL del colorante di corsa loading buffer + 8μL di amplificato PCR e utilizzando come marcatori molecolari un mix del marker VI+III, caricati ai lati del gel per avere un migliore allineamento delle bande.

La corsa elettroforetica è stata impostata prima a 40V per i primi 10 min e poi a 110V per 3 ore utilizzando come tampone di corsa il buffer TBE 0,5X.

Terminata la corsa il gel è stato messo a colorare in una soluzione di bromuro di etidio per 30 min e poi lasciato decolorare in acqua per altri 30 min.

Le immagini sono state scansionate mediante l'utilizzo del GEL DOC XR system (BioRad) utilizzando il software Quantity One Analysis (BioRad) e analizzate mediante il pacchetto software GEL COMPARE II VERSIONE 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Il calcolo delle similarità nei profili delle bande è stato basato sul coefficiente di correlazione di Pearson mediante un algoritmo (Vauterin e Vauterin , 1992) ottenendo un dendrogramma dove è stato possibile valutare il grado di similarità dei vari ceppi isolati.

8.8 CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA

La fase successiva del lavoro, ha previsto la caratterizzazione tecnologica dei batteri isolati, utilizzando come riferimento un ceppo commerciale di *L. plantarum*, il V22, commercializzato dalla Lallemand (Lallemand INC.Succ.Italiana).

Il ceppo V22, è stato selezionato dall'Università del Sacro Cuore di Piacenza, le cui proprietà microbiologiche ed enologiche, come riportato sulla scheda tecnica, sono le seguenti:

- metabolismo omofermentante;
- alcol tolleranza max 15,5% vol;
- pH >3.5 (sensibile ai pH bassi);
- bassa produzione di diacetile;
- nessuna produzione di amine biogene;
- potenzialmente capace di produrre batteriocine attive contro altri microrganismi contaminanti, ed elevate attività enzimatiche di interesse in vinificazione.

Le specie di batteri associate alla fermentazione malolattica nel vino, come detto, appartengono al genere *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, di cui *O. oeni* risulta la specie più resistente alle condizioni di pH bassi presenti nel vino.

A pH maggiori di 3,5 possono sviluppare anche i lattobacilli, infatti tra questo genere alcuni ceppi appartenenti alla specie *L. plantarum* hanno mostrato, da studi fatti, particolari capacità tecnologiche tanto da essere presi in considerazione come possibili starter per la fermentazione malolattica.

La caratterizzazione tecnologica dei ceppi di *L. plantarum* oggetti dello studio è stata effettuata valutando i seguenti punti:

1. Capacità di crescita di *L. plantarum* in Synthetic Wine;
2. Metabolismo dell'acido malico;
3. Produzione di batteriocine;
4. Produzione di ammine biogene;
5. Effetti di malvin-3,5-diglucoside sulla crescita di *L. plantarum*;
6. Analisi dell'attività glucosidasi:
 - capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel rilasciare composti volatili liberi da precursore aromatico commerciale (n-octylglucoside);
 - capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel rilasciare composti volatili liberi da precursore aromatico estratto da uva.

8.8.1 Capacità di crescita di *L. plantarum* in Synthetic Wine

Per la caratterizzazione tecnologica dei ceppi di *L. plantarum* è stata valutata, in primo luogo, la crescita e la capacità nel degradare l'acido malico in terreno sintetico, synthetic wine (Soleri *et al.*, 2009; Carreté *et al.*, 2002), costituito da:

- estratto di lievito 4 g/L,
- glicerolo 2 g/L,
- acido L-malico 6 g/L

Al terreno base sono poi state aggiunte differenti concentrazioni di etanolo ed è stato variato anche il pH, a seconda delle prove effettuate.

Un primo screening è stato effettuato in synthetic wine, la cui composizione base è sopra riportata, addizionato del 14% di etanolo e a pH 3,5 (il pH è stato aggiustato con NaOH 10N).

Il protocollo seguito per la prova è stato il seguente:

- ❖ sono state utilizzate brodocolture overnight fatte crescere in MRS broth a 30°C;
- ❖ è stato raccolto il pellet (carica cellulare 10^8 UFC/mL) mediante centrifugazione a 13000 rpm x 10 minuti;
- ❖ il pellet è stato lavato con soluzione fisiologica sterile;
- ❖ il pellet è stato risospeso ed inoculato in provette contenente 10mL di synthetic wine (pH 3,5 e 14% etanolo) e incubate a 30°C;
- ❖ è stato eseguito un conteggio vitale in piastra (MRS agar) appena dopo l'inoculo (tempo 0), e dopo 5, 10, e 15 giorni di incubazione a 30°C.

Tale prova ha permesso di selezionare 11 ceppi che sono stati sottoposti alle successive prove di caratterizzazione tecnologica.

Gli undici ceppi selezionati (A1, GT1, M17, M25, M27, M28, M29, P1, P5, P6, T11) sono stati testati in terreno synthetic wine con diversi valori di pH e diverse concentrazioni di etanolo. La composizione dei terreni utilizzati, contraddistinti con le lettere A, B, C, D ed E, è riportata nella tabella 17.

Tabella 17 Composizione dei terreni

Terreno	pH	EtOH (%v/v)
A	3,0	10
B	3,2	11
C	3,2	13
D	3,5	11
E	3,5	13

Il protocollo seguito per questa prova è stato il seguente:

- ❖ sono state utilizzate brodocolture overnight in MRS broth;
- ❖ è stato raccolto il pellet (carica cellulare 10^8 UFC/mL) mediante centrifugazione a 13000 rpm x 10 minuti;
- ❖ il pellet è stato lavato con soluzione fisiologica sterile;
- ❖ il pellet è stato risospeso ed inoculato in provette contenente 10mL dei diversi terreni precedentemente preparati (A, B, C, D, E);
- ❖ è stato eseguito un conteggio vitale in piastra (MRS agar), appena dopo l’inoculo (tempo 0) e dopo 5, 10 e 15 giorni di incubazione a 30°C;
- ❖ contemporaneamente, utilizzando sempre gli stessi terreni, si è proceduto a valutare la capacità dei ceppi nel degradare l’acido malico utilizzando un Kit enzimatico (Steroglass), seguito da letture spettrofotometriche a 340 nm. La determinazione è stata effettuata subito dopo l’inoculo dei ceppi nei terreni (tempo 0) e dopo 5, 10, 15 e 20 giorni di incubazione a 22°C.

La capacità di crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* selezionati è stata, poi, ulteriormente valutata in synthetic wine a diversi valori di pH, a diverse concentrazioni di SO₂, aggiunta come metabisolfito di potassio (K₂S₂O₅), e diverse concentrazioni di etanolo.

In dettaglio, la composizione dei terreni utilizzati, è riportata nella tabella 18.

Tabella 18 Composizione dei terreni

Terreno	pH	K₂S₂O₅(mg/L)	EtOH (%v/v)
F	3,0	20	/
G	3,0	50	/
H	3,0	100	/
I	3,2	20	/
L	3,2	50	/
M	3,2	100	/
N	3,5	20	/
O	3,5	50	/
P	3,5	100	/
Q	3,2	20	13
R	3,5	20	13

Il protocollo utilizzato per la prova è stato uguale a quello sopra riportato.

La prova ha permesso di stimare la capacità di crescita dei ceppi e la loro capacità ad adattarsi a condizioni sfavorevoli come quelle riscontrate nei terreni, e cioè dovute ai bassi valori di pH, all’aggiunta di K₂S₂O₅, alla presenza di etanolo, e in carenza di fonti di nutrizione, simulando così il più possibile l’ambiente vino in cui essi dovranno svolgere il loro ruolo di potenziali starter.

8.8.2 Produzione di batteriocine

La valutazione della capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel produrre batteriocine è stata effettuata mediante l'ausilio di due metodiche analitiche.

La prima tecnica ha previsto un saggio in piastra (**drop diffusion-agar test**). La procedura seguita è la seguente:

- ❖ i ceppi sono stati inoculati in 10mL di MRS broth ed incubati a 30°C (overnight);
- ❖ 10mL della brodocoltura sono stati centrifugati a 10000rpm x 10min a 4°C;
- ❖ è stato recuperato il surnatante ed il pH è stato aggiustato a 6,0 con NaOH 0.1M. Questo passaggio è importantissimo perché permette di evitare l'eventuale presenza di aloni di inibizione dovuti al fattore pH acido (acidificazione del terreno in seguito allo sviluppo dei ceppi nel medium di coltura).
- ❖ il surnatante è stato filtrato con filtro 0.45µm;
- ❖ sono stati prelevati 10µL del filtrato e sono stati eseguiti due spot per ogni ceppo, su piastra contenente MRS agar. Insieme ai ceppi sulla piastra, come controllo, sono stati eseguiti gli spot con la batteriocina (Lacticina 3147) e acqua milliQ;
- ❖ le piastre sono state lasciate asciugare sotto cappa;
- ❖ sulle piastre asciugate è stato versato MRS soft agar (0.7% agar) contenente il ceppo 86 di *Pediococcus pentosaceus* (CIAL-86).
- ❖ le piastre sono state messe ad incubare per 24 ore a 30°C.

La scelta del microrganismo di controllo *Pediococcus pentosaceus* (CIAL-86).è stata fatta in base agli studi effettuati presso l'Istituto CIAL-UAM di Madrid dove è stato isolato il microrganismo, i cui risultati hanno dimostrato che il ceppo 86 di *Pediococcus* è sensibile alla lacticina 3147. Tale batteriocina è stata estratta dal ceppo *L. lactis* IFPL105 sempre presso il CIAL-UAM di Madrid (García-Ruiz *et al.*, 2013).

La seconda tecnica analitica utilizzata per lo studio è il **MALDI TOF/TOF**.

La prima fase ha previsto un inoculo dei ceppi in MRS agar e le piastre sono state poste ad incubare overnight a 30°C.

Per ogni ceppo è stata prelevata una colonia e stemperata (in doppio) direttamente sulla piastra di acciaio (*ground steel* MALDI target) dello strumento e lasciata asciugare all'aria, fromando una sottile patina.

Sulla patina formatasi è stata applicata 1µL della matrix solution (soluzione satura di acido α -ciano-4-idrossicinnamico in aceto nitrile al 50% e ac. trifluoroacetico al 2.5%) e fatto seccare tutto all'aria.

L'analisi è stata eseguita con uno spettrometro di massa a 337nm (Autoflex; Bruker Daltonics) mediante l'utilizzo del software di controllo AUTOFLEX III (Bruker Daltonics) ottenendo così degli spettri da 2-20 KD in forma automatica, lavorando in modo lineare positivo a una frequenza di 200 Hz. Dall'analisi degli spettri ottenuti è stato determinato se i ceppi erano produttori o meno di batteriocine.

8.8.3 Produzione di ammine biogene

La capacità o meno di produrre ammine biogene da parte dei ceppi di *L. plantarum* è stata determinata applicando, anche in questo caso, due metodiche analitiche:

1. utilizzo di un terreno di coltura al quale sono stati aggiunti gli amminoacidi precursori (metodo qualitativo);
2. mediante RP-HPLC (*reversed phase high performance liquid chromatography/cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa*) con fluorimetro (metodo quantitativo).

1. Utilizzo del terreno di coltura

Prevede l'utilizzo di un terreno di coltura specifico al quale sono stati addizionati gli amminoacidi precursori. La composizione del terreno è riportata in tabella 19.

Tabella 19 Composizione del terreno

triptone	5g/L
estratto di lievito	5g/L
estratto di carne	5g/L
cloruro di sodio	2,1g/L
glucosio	1g/L
tween 80	1ml/L
MgSO ₄	0,02g/L
MnSO ₄	0,05g/L
FeSO ₄	0,04g/L
ammonio citrato	2g/L
K ₂ PO ₄	2g/L
piridossal-5-fosfato	0,01g/L
amminoacido	10g/L
bromocresol purple	0,06g/L
agar	20g/L
pH	5,3

Un risultato positivo, la produzione di ammine biogene, è indicato dal viraggio del colore del terreno, da marrone a viola, dovuto al cambiamento di pH. La variazione di pH è dipendente dalla produzione delle ammine biogene a partire dagli aminoacidi inizialmente inclusi nel terreno, le quali provocano un alcalinizzazione del mezzo. Questo discorso vale per tutti gli amminoacidi tranne per la tirosina, dove il risultato positivo è dato dalla presenza di un alone di chiarificazione risultante dalla scomparsa del precipitato. La tirosina, infatti, avendo una bassa solubilità, anche se utilizzata a basse concentrazioni, tende a precipitare, le piastre non risultano traslucide, inoltre non

si ha il caratteristico cambiamento di colore del terreno. Per la prova sono stati utilizzati i seguenti amminoacidi precursori: tirosina, fenilalanina, istidina, ornitina e lisina.

I ceppi sono stati fatti crescere overnight in MRS broth a 30°C, dopodiché si è proceduto ad effettuare gli spot sulle piastre contenenti il medium con i diversi amminoacidi. La prova è stata eseguita in doppio e come controllo sono state utilizzate le piastre contenente il terreno senza aggiunta di amminoacidi dove sono stati strisciati i ceppi. Le piastre sono state incubate per 4 giorni a 30°C in giare per anaerobiosi dopodiché si è proceduto alla lettura delle piastre e all’analisi dei risultati.

2. RP-HPLC

Per uno studio più approfondito e per quantificare anche l’eventuale produzione o meno di ammine biogene, è stata utilizzata la tecnica RP-HPLC con rilevatore a fluorescenza. Come terreno di coltura per far crescere i ceppi è stato utilizzato MRS broth addizionato dei corrispondenti amminoacidi precursori (tabella 20).

Tabella 20 Amminoacidi precursori

Amminoacidi	
Tirosina (MRST)	2 g/L
Istidina (MRSI)	5 g/L
Ornitina (MRSO)	5 g/L
Fenilalanina (MRSF)	5 g/L
Lisina (MRSL)	5 g/L

Ogni amminoacido è stato inoculato individualmente. La tirosina è stata utilizzata ad una concentrazione più bassa, in quanto non si dissolveva bene nel mezzo di coltura. Per la prova è stato effettuato un inoculo cellulare dei ceppi, nei terreni contenenti gli amminoacidi precursori, pari a 10⁸ UFC/mL dopodiché sono stati messi ad incubare a 30°C per 7 giorni sotto agitazione a 80rpm.

Trascorso il periodo di incubazione si è proceduto come di seguito riportato:

- Sono stati prelevati 2mL di brodocoltura e centrifugati a 4000rpm x 10 min a 5°C.
- E’ stato raccolto il surnatante e 1mL di esso è stato filtrato con filtro da 0,22µm e posto nelle vials per HPLC.
- Per la prova, inoltre, è stato filtrato e messo nelle vials anche 1mL di acqua milliQ ed 1mL del terreno MRS contenente l’amminoacido senza la coltura batterica (come controllo), 1mL di tampone borato (0.4M pH10-10.5), 1mL dello standard e 1mL di OPA.

Le concentrazioni degli standard, preparati in soluzione acqua-etanolo (60:40) è riportata nella tabella 21 (Marcobal *et al.*, 2005).

Tabella 21 Ammine biogene utilizzate

Ammina	Concentrazione
Istamina	1,2 g/L
Metilamina	0,2 g/L
Etilamina	0,2 g/L
Tiramina	0,8 g/L
Fenilettilamina	1 g/L
Putrescina	3 g/L
Cadaverina	3 g/L

Prima del suo utilizzo lo standard è stato diluito in una soluzione di acqua/etanolo al 10%.

Procedura di derivatizzazione

La formazione dei derivati *o*-ftalici è stata eseguita automaticamente. L’OPA-MCE è un reattivo derivatizzante, in un medio alcalino, il gruppo amminico primario dell’ammina biogena reagisce con l’ortoftalaldeide (OPA) in presenza di mercaptoetanolo (MCE) per formare dei derivati fluorescenti del tipo pseudo-indolo. I seguenti derivati possono essere separati tramite HPLC.

La soluzione di reazione risultava costituita da 350 mg di *o*-ftalaldeide (OPA) e da 2,5 mL di 2-mercaptoetanolo (MCE) in 47,5 mL di metanolo. Il reagente OPA-MCE non è stato utilizzato fino a 24 ore dopo la preparazione. Per la reazione di derivatizzazione, 16µL dei campioni sono stati mescolati automaticamente con 6µL di tampone borato (0,4 M, pH 10,5) e 12µL della soluzione di reazione. I campioni filtrati sono stati iniettati direttamente nel sistema HPLC.

Condizioni cromatografiche

Per la corsa sono state utilizzate la fase A costituita da disodio idrogeno fosfato dodecaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 3.6g/L pH 9) e la fase B costituita dall’1% di 2-octanolo in acetonitrile e dalla fase A (70:30 v/v). Il flusso è stato impostato a 0.80 ml/min 70% fase A e 30% di fase B.

Ogni campione e’ stato iniettato in doppio. Per la corsa cromatografica come strumento è stato utilizzato un WATERS 600 controller programable solvent module (Waters, Milford, MA), un autocampionatore Wisp 710B (Waters, Milford, MA) e un rivelatore a fluorescenza (Hawlett-Packard). I dati cromatografici sono stati analizzati mediante un programma Millenium System (Waters, Milford, MA). La separazione è stata ottenuta utilizzando una colonna cromatografica Waters Nova-Pak C_{18} (150x3.9mm i.d., 60Å, 4µm) con una precolonna della stessa tipologia.

Le ammine derivatizzate sono state rilevate utilizzando un rivelatore di fluorescenza (lunghezza d’onda di eccitazione di 340nm e di emissione di 425nm).

Per controllare il sistema RP-HPLC è stato utilizzato un programma Empower Pro (Waters, Milford, MA).

8.8.4 Effetti di malvin-3,5-diglucoside sulla crescita di *L. plantarum*

La malvidina è l'antociano maggiormente presente nei vacuoli delle cellule della buccia dell'acino di uva, inoltre è il più resistente alle reazioni di ossidazione durante la fermentazione, quindi, è la sostanza che viene perduta meno rispetto agli altri antociani per cui anche la sua percentuale nel vino è maggiore. Per questo motivo è stata valutata, nella seguente prova, l'influenza della sostanza fenolica, malvin-3,5-diglucoside, sulla crescita dei ceppi di *L. plantarum*.

I ceppi sono stati inoculati in MRS broth a pH 3,5 addizionato del composto alle diverse concentrazioni: 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL.

Per la prova si è proceduto come descritto da Tabasco *et al.* (2011) con alcune modifiche.

Per l'inoculo sono stati prelevati 100 µL della coltura cellulare fatta crescere in MRS broth overnight

Per avere la carica cellulare iniziale identica per ogni ceppo batterico, con lo stesso volume di brodocoltura, è stato effettuato, prima dell'inoculo, un controllo della densità ottica mediante letture spettrofotometriche a 600 nm (OD_{600}), ed è stata aggiustata la densità ottica ad 1,00 mediante diluizione.

Come controlli sono stati utilizzati:

- ❖ 100 µL di MRS pH 3,5 addizionato di 100 µL di malvin-3,5-diglucoside alle diverse concentrazioni: 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL.
- ❖ 100 µL di MRS pH 3.5 addizionato di 100 µL di coltura batterica senza il composto fenolico.
- ❖ 100 µL di MRS pH 6,0 addizionato di 100 µL di coltura batterica.

I campioni e i relativi controlli sono stati caricati in una micropiastra sterile contenente 96 pozzetti (Sarstedt Inc., Newton, USA). La crescita batterica per 20 ore, a 30°C, in aerobiosi, è stata monitorata ad intervalli di tempo di 120 minuti mediante lettura della densità ottica a 600nm (OD_{600}) utilizzando un lettore di micropiastre automatizzato (Varioskan Flash, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland).

Tutte le determinazioni sono state fatte in triplo.

8.8.4 Analisi dell'attività glucosidasica

8.8.4.1 Capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico commerciale (n-octylglucoside)

Il protocollo seguito per la seguente prova e quello descritto da Muñoz-González (2013) con alcune modifiche.

E' stato eseguito un test preliminare per valutare la concentrazione ideale del composto da utilizzare e i tempi necessari per l'idrolisi del composto. Dalla prova è emerso che i ceppi, appena dopo l'inoculo (tempo 0 ore), hanno idrolizzato il composto, per questo motivo l'analisi è stata fatta solamente a 0 ore.

La prova è stata impostata come segue:

1. Per ogni ceppo sono stati prelevati 100µL di coltura cellulare, inoculati in 10mL di MRS ed incubati a 30°C.
2. Le brodoculture overnight sono state inoculate con il precursore commerciale n-octylglucoside ad una concentrazione pari a 5ppm (Sigma Aldrich 29836-26-8) e incubate a 30°C.
3. E' stata eseguita l'analisi del corrispondente aglicone, 1-octanol, mediante sistema HS-SPME-GC-MS a 0 ore.

Per la prova sono stati utilizzati due controlli, uno senza la coltura batterica ed uno senza il precursore glucosidico. Come confronto, sono stati utilizzati, due ceppi testati nell'Istituto CIAL di Madrid, che non hanno attività glucosidasica: il ceppo **85** (*Pediococcus pentosaceus*) e il ceppo **94** (*Lactobacillus paracasei*).

Analisi HS-SPME-GC-MS

Procedura HS-SPME (head space solid phase microextraction/microestrazione in fase solida con spazio di testa)

Sono stati prelevati 2mL della brodocultura inoculata con il precursore glucosidico, posti nella vials da 20mL, aggiunti di 0,5g di NaCl e sigillati con un tappo di PTFE/silicone (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

La procedura di estrazione è stata effettuata automaticamente utilizzando un CombiPal system (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) con una fibra DVB/CAR/PDMS di 50/30µm e 2cm di lunghezza (Supelco, Bellefonte, PA).

I campioni sono stati prima incubati per 5 minuti a 30°C e successivamente sottoposti ad estrazione, eseguita sullo spazio di testa di ciascuna vials. Tutte le analisi sono state effettuate in doppio.

GC-MS (analisi Gas Cromatografica- spettrometro di Massa)

Una volta estratti, sono stati iniettati nel Gas Cromatografo (Agilent 6890N, Agilent, Palo Alto, CA) a 270°C.

Per controllare il sistema GC-MS è stato utilizzato un Agilent MSD ChemStation Software, per la separazione è stata utilizzata una colonna capillare Supra-Wax (60m x 0.25mm x 0.50µm film) della Konik (Barcelona, Spain). Come gas di trasporto è stato utilizzato elio a una velocità di flusso di 1mL/min inizialmente la temperatura è stata mantenuta a 40°C per 5 min e dopo è stata incrementata di 4°C/min fino a raggiungere i 240°C mantenuta per 20 min.

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa MS (Agilent 5973N) in Scan (da 35 a 350 amu) e Sim modes per i specifici composti (electronic impact mode, 70eV).

L'identificazione del composto è stata effettuata comparando il tempo di ritenzione e lo spettro di massa del composto di riferimento con quello riportato nel database (mass spectrum library) NIST 2.0. La quantificazione è stata ottenuta calcolando il relativo picco dell'area del composto.

8.8.4.2 Capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico estratto da uva

E' stata valutata la capacità dei ceppi di *L. plantarum* di liberare composti volatili, in grado di migliorare le caratteristiche organolettiche dei vini, da un precursore naturale presente nelle uve. Infatti, molti batteri lattici possono essere in grado di degradare un precursore commerciale (sintetico) e possono trovare difficoltà quando vengono messi a contatto con un composto del tutto naturale. È stata eseguita, in primo luogo, l'estrazione del precursore aromatico da un campione di uva, mediante estrazione come descritto da Hernandez-Orte *et al.* (2009) con alcune modifiche.

Dieci chilogrammi di uva bianca è stata diraspata, agli acini sono stati aggiunti 7,5g di CaCl₂ (per inibire le attività enzimatiche) e 25mg di ac. ascorbico (come antiossidante).

Gli acini sono stati schiacciati e il succo è stato filtrato in modo da poter separare il mosto dalle bucce.

- Le bucce sono state poste a macerare in bottiglie di vetro contenente una soluzione tampone (0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,0 e 13% di etanolo v/v) per 36 ore a temperatura ambiente, al buio ed eliminando l'ossigeno mediante utilizzo di azoto. Trascorso tale tempo la soluzione è stata centrifugata a 14000rpm x 15 min a 20°C, il surnatante è stato filtrato e privato dell'etanolo mediante l'utilizzando di un rotovapor R-200 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) a 4 °C.
- Il mosto è stato conservato in frigo a 4°C fino alla fase di estrazione.

Il precursore glucosidico è stato isolato mediante estrazione in fase solida utilizzando una resina, l'Amberlite XAD-2 della Supelco (Bellefonte, PA, USA) impacchettata in

una colonna di vetro (20cm di lunghezza/63 cm³ di resina). La colonna è stata condizionata utilizzando 150mL di diclorometano, 150mL di metanolo e 150mL di acqua milliQ. Dopo il passaggio del mosto e del tampone senza le bucce, la colonna è stata lavata con acqua (300mL) per rimuovere i componenti altamente polari e a seguire con una soluzione di pentano/diclorometano (300mL) (2:1 v/v) per rimuovere i composti volatili liberi e alla fine il precursore aromatico è stato eluito con 300mL di una soluzione acetato di etile/metanolo (9:1 v/v). L'eluito così ottenuto, contenete il precursore, è stato sottoposto ad evaporazione utilizzando un rotovapor R-200 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) a 4 °C per eliminare il solvente. Successivamente, è stato sospeso in acqua milliQ e lavato due volte con la soluzione di pentano/diclorometano per rimuovere ogni traccia dei composti volatili liberi. L'estratto è stato liofilizzato e conservato a -20°C fino al momento del suo utilizzo.

Per la valutazione dell'attività enzimatica glucosidasica sono stati utilizzati due controlli:

- MRS senza coltura batterica
- MRS con la coltura batterica e senza precursore glucosidico

Il protocollo seguito è di seguito riportato:

1. i ceppi sono stati incubati a 30°C in 10mL di MRS.
2. le brodocolture overnight di *L. plantarum* sono state inoculate con 200µL del precursore glucosidico estratto da uva ed incubate a 30°C. Prima del suo utilizzo il precursore (liofilizzato) è stato ricostituito con acqua milliQ.
3. E' stata eseguita l'analisi dei corrispondenti agliconi, prodotti dall'idrolisi del precursore, mediante **sistema HS-SPME-GC-MS** a 0 ore, 2 ore e 24 ore (come spiegato precedentemente)

CAPITOLO 9

RISULTATI E DISCUSSIONE

9.1 Risultati delle analisi chimico-fisiche dei vini

Nella tabella 22 sono riportati i valori relativi alle analisi chimico-fisiche effettuate sui 23 campioni di vino. I dati mostrano che i valori di pH variano da un minimo di 3,42 (per il campione RMC) ad un massimo di 3,88 (per il campione AGA); questi valori rispettano precisamente i tipici valori di vini rossi prodotti nell’Italia Meridionale (Gambuti *et al.*, 2007; Suzzi *et al.*, 2012). Per quanto riguarda il contenuto in alcol i campioni di Aglianico, Taurasi, e Tintilia, come ci si aspettava, hanno mostrato i valori più alti. I valori di acidità totale più elevati sono stati riscontrati nei campioni di Aglianico, Montepulciano e Tintilia. I dati ottenuti possono essere attribuiti a numerosi fattori e principalmente alla varietà dell’uva, all’origine e alle tecniche di vinificazione.

Tabella 22 Analisi chimico-fisiche dei vini

Campioni	Tipologia vino	Provenienza	pH	Alcol (% v/v)	ac.L-Malico (g/L)	ac.L-Lattico (g/L)	ac.totale (g/L)
AGA	Aglianico	Campania	3,88	13,6	0,1	2,3	6,9
AGB	Aglianico	Campania	3,71	13,6	0,8	2,1	6,6
MTA	Montepulciano	Molise	3,68	13,5	0,9	1,9	6,3
MTB	Montepulciano	Molise	3,70	13,3	0,6	1,4	6,4
MTG	Montepulciano	Molise	3,65	12,2	0,5	2,2	6,2
MTC	Montepulciano	Molise	3,60	13,2	1,2	2,4	6,9
MTD	Montepulciano	Molise	3,79	12,8	1,1	2,5	5,6
MTE	Montepulciano	Molise	3,80	12,6	1,4	2,3	5,4
PIN	Pentro d’Isernia	Molise	3,77	11,8	1,3	1,8	5,9
PID	Pentro d’Isernia	Molise	3,76	11,6	0,7	1,6	5,9
PDA	Piedirosso	Campania	3,68	12,6	0,4	1,9	6,1
PDS	Piedirosso	Campania	3,62	12,4	0,6	1,8	6,2
PDL	Piedirosso	Campania	3,65	12,8	0,4	2,1	6,5
RMC	Rosso Molise	Molise	3,42	13,5	0,9	1,6	5,8
RMD	Rosso Molise	Molise	3,80	12,1	1,6	2,3	5,9
TAB	Taurasi	Campania	3,76	13,2	1,5	1,8	6,0
TAS	Taurasi	Campania	3,69	13,1	1,4	1,9	5,9
TSB	Tintilia	Molise	3,54	14,6	0,2	1,9	6,2
TSD	Tintilia	Molise	3,86	14,2	0,4	2,2	6,8
TSE	Tintilia	Molise	3,76	14,0	0,6	1,9	7,4
TSG	Tintilia	Molise	3,86	14,3	0,7	1,5	7,6
PIL1	Tintilia	Molise	3,80	14,0	0,3	1,3	6,6
PIL3	Tintilia	Molise	3,70	14,4	0,8	1,8	6,5

9.2 Risultati isolamento ed identificazione dei batteri

I risultati relativi all'isolamento batterico hanno mostrato, indipendentemente dalla tipologia di vino da cui sono stati isolati, differenti valori di carica microbica che variano da $4,0 \times 10^2$ UFC/mL, nel campione MTB, a $8,8 \times 10^6$ UFC/mL nel campione TSB. Nella tabella 23 sono riportati i risultati del conteggio vitale in piastra espressi in unità formanti colonie su millilitro (UFC/mL).

Tabella 23 Risultati conteggio vitale dei batteri

Campioni	Tipologia	MRS*
AGA	Aglianico	$6,5 \times 10^4$
AGB	Aglianico	$5,0 \times 10^2$
MTA	Montepulciano	$6,0 \times 10^3$
MTB	Montepulciano	$4,0 \times 10^2$
MTG	Montepulciano	$3,3 \times 10^3$
MTC	Montepulciano	$5,5 \times 10^5$
MTD	Montepulciano	$5,8 \times 10^5$
MTE	Montepulciano	$4,8 \times 10^6$
PIN	Pentro d'Isernia	$2,4 \times 10^5$
PID	Pentro d'Isernia	$2,2 \times 10^3$
PDA	Piedirosso	$7,8 \times 10^3$
PDS	Piedirosso	$7,5 \times 10^3$
PDL	Piedirosso	$6,8 \times 10^3$
RMC	Rosso Molise	$9,8 \times 10^3$
RMD	Rosso Molise	$1,2 \times 10^5$
TAB	Taurasi	$2,3 \times 10^3$
TAS	Taurasi	$4,3 \times 10^3$
TSB	Tintilia	$8,8 \times 10^6$
TSD	Tintilia	$3,4 \times 10^5$
TSE	Tintilia	$4,5 \times 10^5$
TSG	Tintilia	$2,8 \times 10^6$
PIL1	Tintilia	$6,6 \times 10^5$
PIL3	Tintilia	$8,9 \times 10^4$

9.3 Caratterizzazione fenotipica

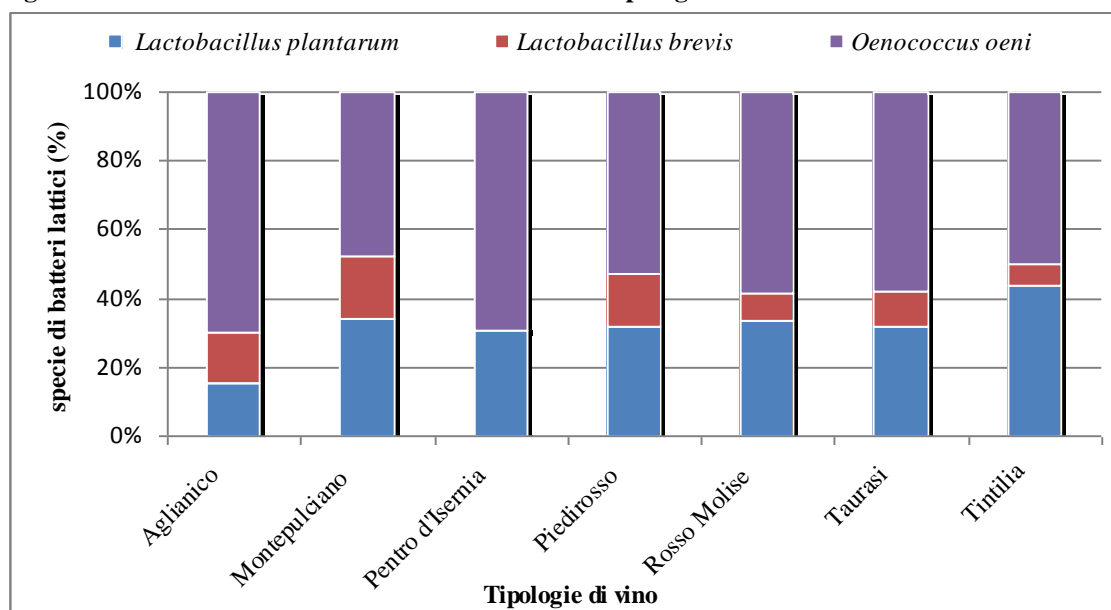
Dei 184 isolati, 80 sono risultati Gram positivi, catalasi negativi e di forma bastoncellare, presumibilmente identificabili come lattobacilli, in accordo con la descrizione del genere e della specie riportata nel Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler and Weiss, 1986).

L'utilizzo delle gallerie API50 CHL ha permesso di raggiungere a una più chiara identificazione degli 80 isolati in esame. Con il test fermentativo sono stati identificati 22 come *L. brevis* e 58 come *L. plantarum*.

I restanti 104 isolati sono risultati di forma sferica, Gram positivi, catalasi negativi raggruppati a catenelle di piccola e media lunghezza, identificabili come cocchi, presumibilmente appartenenti alla specie *Oenococcus oeni* in accordo con la descrizione del genere e della specie riportata nel Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler and Weiss, 1986); questi ultimi sono stati scartati perché non di interesse per il seguente studio.

Nella figura 2 è riportata la distribuzione, in percentuale, delle specie batteriche isolate dalle varie tipologie di vino campionati.

Figura 2 Distribuzione dei batteri lattici nelle diverse tipologie di vino



Come si può notare dal grafico i ceppi di *L. plantarum* sono stati isolati principalmente dai vini Tintilia e Montepulciano, evidentemente dovuto a fattori pedoclimatici, alla tipologia ed alle tecniche di vinificazione adottate.

Nella tabella 24 sono illustrati i risultati ottenuti dalle gallerie API 50CHL in dettaglio è riportata la sigla dei ceppi, le fonti di carbonio, i profili fermentativi dei ceppi, la specie identificata e la percentuale di affinità.

I 58 ceppi di *L. plantarum* sono stati mantenuti in collezione a -80°C in glicerolo al 40% e l'ulteriore lavoro di identificazione è proseguito solo su questi.

Tabella 24 Profili fermentativi dei 58 ceppi isolati da 23 campioni di vino.

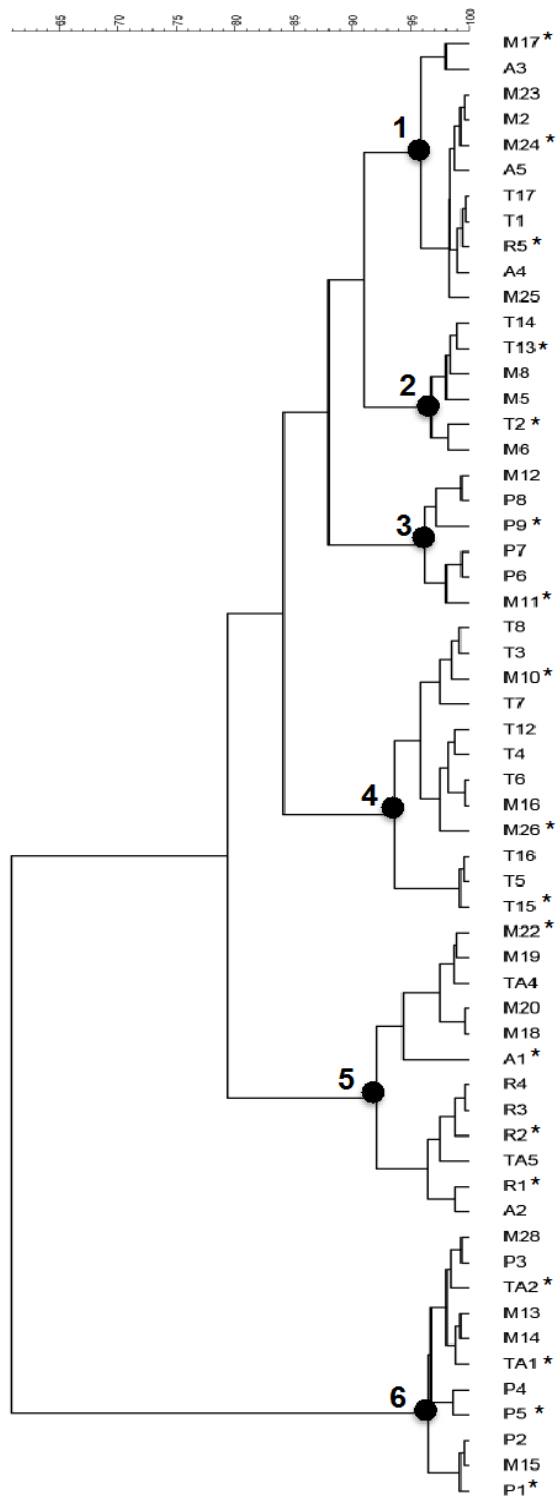
Ceppi	Glicerolo	Eritrolo	D-Arabinosio	L-Arabinosio	D-Ribosio	D-Xilosio	L-Xilosio	D-Adonitolo	Metil-BD-Xilopiranoside	D-Galattosio	D-Glucosio	D-Fruuttosio	D-Mannosio	L-Sorbosio	L-Ramnosio	Dulcitolio	Inositolo	D-Mannitolo	D-Sorbitolo	Metil-aD-Mannopiranoside	Metil-aD-Glucopiranoside	N-AcetilGlucosamina	Amigdalina	Arbutina	Esculina	Salcina	D-Celobiosio	D-Maltosio	D-Lattosio	D-Melibiosio	D-Saccarosio	D-Trealosio	Inulina	D-Melezzitosio	D-Raffinosio	Metadone	Glicogeno	Xilitolo	Gentiobiosio	D-Turanosio	D-Lixosio	D-Tagatosio	D-Fucosio	L-Fucosio	D-Arabitolo	L-Arabitolo	Gluconato di potassio	2-chetogluconato di potassio	5-chetogluconato di potassio	Specie identificata	affinità				
P3, P4, P5, M6, M8, M28	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%				
A1, A2, A5, M11, M12, T3, T4,	+	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%		
TA1, TA2, M2, M5	V	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%			
M10, TA4, TA5, A3, A4	V	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%		
P1, P2, P9, M13, M14	V	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%		
R1, R2, R5, M16, M17, M18	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%		
T1, T2, T8, T12, R3, R4, T13	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%		
T14, T15, P6, P7, P8, T16, T17	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	V	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%	
T5, T6, T7, M15, M19, M20, M22, M23, M24, M25, M26	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	V	-	+	-	-	-	<i>L. plantarum</i>	99,9%
T30, T31, M45, T22	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. brevis</i>	99,8%	
T33, M31, P11	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	<i>L. brevis</i>	99,0%	
M60, M58, R12, R32	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>L. brevis</i>	83,7%	
M57, A11, A12	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>L. brevis</i>	99,9%	
R9, R10, TA32, TA30	-	-	-	V	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>L. brevis</i>	98,9%	
M47, M48, P10, A8	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	V	+	-	<i>L. brevis</i>	99,2%	

9.4 Identificazione genetica

L'identificazione dei 58 ceppi di *L. plantarum* è stata confermata mediante analisi PCR-DGGE. Nella figura 3 è riportato il dendrogramma che mostra il grado di similarità (Pearson Correlation) dei profili DGGE dei ceppi selezionati.

I ceppi sono stati raggruppati, in accordo con il loro profilo di migrazione, in 6 cluster. Dall'analisi dei cluster sono stati selezionati 18 ceppi e inviati ad una ditta esterna per il sequenziamento (Eurofin MWG Biotech Company, Ebersberg, Germany); evidenziati nella figura mediante asterisco.

Figura 3 Dendrogramma dei profili DGGE dei 58 ceppi di batteri lattici
* sono contraddistinti i ceppi selezionati per il sequenziamento



Il sequenziamento ha permesso l'identificazione di 18 ceppi e nella tabella 25 sono riportati i risultati ottenuti. Integrando questi risultati con quelli ottenuti dall'analisi dei cluster della DGGE è stato possibile identificare tutti i 58 ceppi come *L. plantarum*.

Tabella 25. Identificazione basata sul confronto dei dati del blast program in Gen Bank di 18 ceppi selezionati sulla base di analisi dei cluster DGGE

Cluster	Ceppi	Dimensioni	Specie	% di Affinità	Fonte ^a
1	M17	664	<i>Lb. plantarum</i>	100%	GU138574
	M24	584	<i>Lb. plantarum</i>	100%	GQ922601
	R5	635	<i>Lb. plantarum</i>	99%	JQ278711.1
2	T13	634	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JF728278.1
	T2	636	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JF728278.1
3	P9	636	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
	M11	635	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
4	M10	667	<i>Lb. plantarum</i>	99%	FJ915780
	M26	650	<i>Lb. plantarum</i>	99%	GU138574
	T15	616	<i>Lb. plantarum</i>	99%	JQ278711.1
5	M22	481	<i>Lb. plantarum</i>	99%	JQ278711.1
	A1	634	<i>Lb. plantarum</i>	100%	GU138574
	R2	636	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
	R1	634	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
6	TA2	635	<i>Lb. plantarum</i>	99%	AB112083.1
	TA1	637	<i>Lb. plantarum</i>	99%	AB112083.1
	P5	611	<i>Lb. plantarum</i>	99%	GU299081.1
	P1	611	<i>Lb. plantarum</i>	99%	GU299081.1

^a numero di accesso alla sequenza dal blast program.

Sulla base dei risultati ottenuti dalla DGGE, i ceppi, appartenenti alla specie *L. plantarum*, sono stati ulteriormente caratterizzati mediante RAPD-PCR.

I profili ottenuti con i primer M13 e D8635 hanno evidenziato una biodiversità tra i ceppi, tutti appartenenti alla specie *L. plantarum*. La RAPD-PCR come riportato da alcuni autori (Andrighetto *et al.*, 2004; Catzeddu *et al.*, 2006), è una buona tecnica per la biotipizzazione dei lattobacilli e per ottenere informazioni sulla diversità genetica.

In particolare dall'analisi del dendrogramma ottenuto mediante RAPD è stato trovato che c'è anche una forte relazione tra i diversi cluster e l'origine del vino (tipologia di vino). Considerando i profili delle bande mostrati nel dendrogramma riportato in figura 4, i ceppi di *L. plantarum* analizzati, sono stati divisi in undici cluster:

Cluster A: 4 ceppi tutti isolati da vino Montepulciano.

Cluster B: 1 ceppo isolato da vino Montepulciano.

Cluster C: 10 ceppi isolati da vino Montepulciano.

Cluster D: 6 ceppi isolati da vino Montepulciano.

Cluster E: 9 ceppi isolati da vino Piediroso e Pentro d'Isernia.

Cluster F: 5 ceppi isolati da vino Aglianico.

Cluster G: 5 ceppi isolati da vino Rosso Molise.

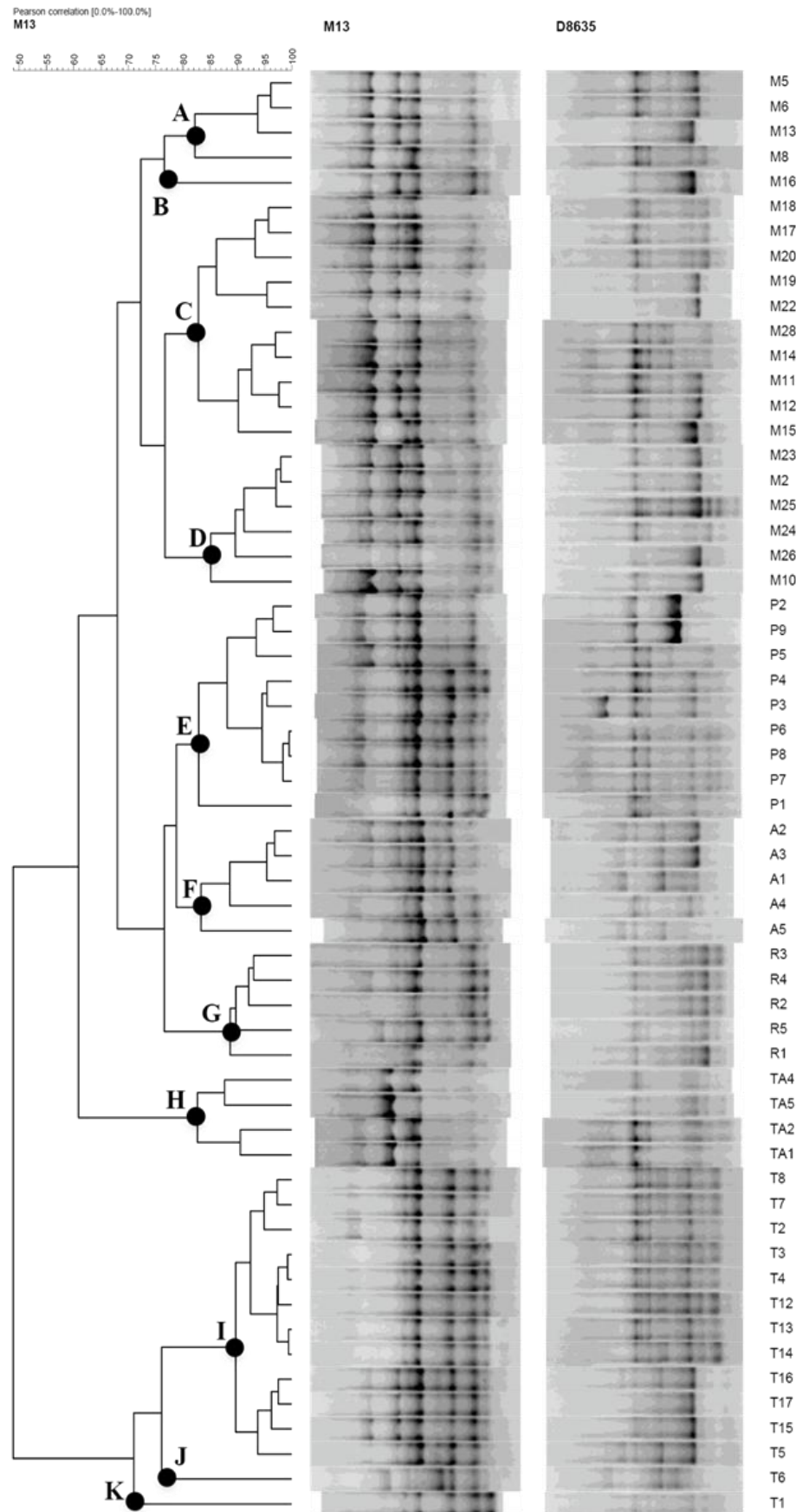
Cluster H: 4 ceppi isolati da vino Taurasi.

Cluster I: 12 ceppi isolati da vino Tintilia.

Cluster J: 1 ceppo isolato da vino Tintilia.

Cluster K: 1 ceppo isolato da vino Tintilia.

Figura 4 Dendrogramma che mostra i profili RAPD dei ceppi di *L. plantarum*.



RISULTATI CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA

9.5 Crescita di *L. plantarum* in Synthetic Wine

I 58 ceppi identificati come *L. plantarum*, sono stati sottoposti ad una preliminare prova di selezione, valutando la loro capacità di crescita in terreno synthetic wine a pH 3,5, con un contenuto in etanolo pari al 14% e privo di fonti di nutrizione.

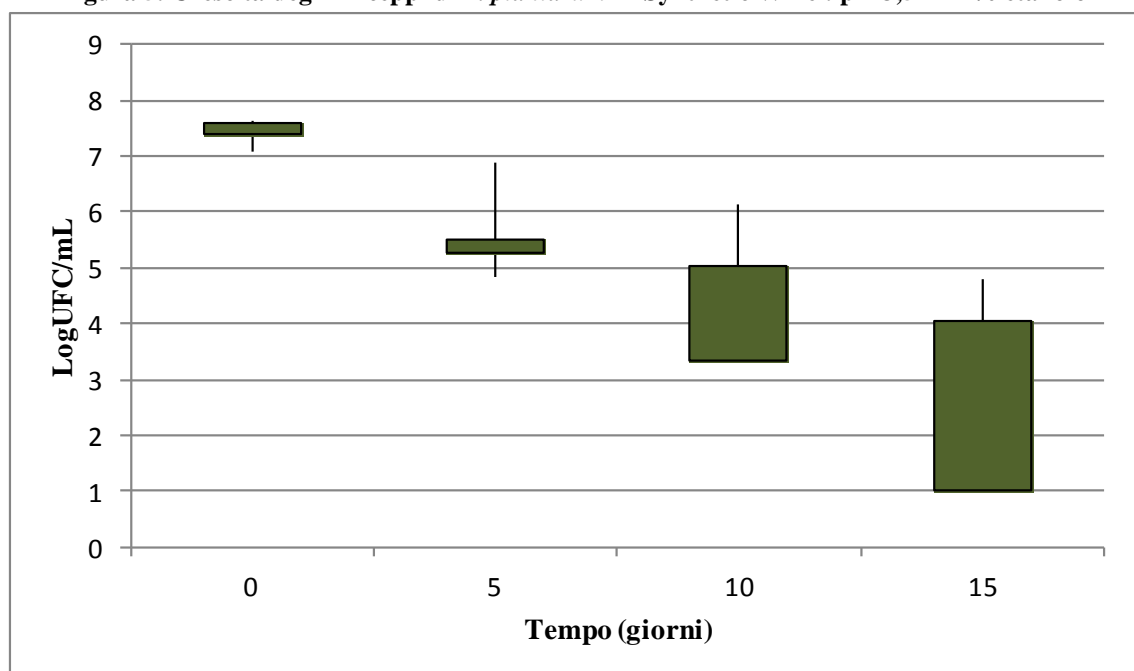
I ceppi sono stati incubati a 30°C per un periodo di 15 giorni, controllandone la carica cellulare ad intervalli di tempo regolari (0, 5, 10, 15 giorni).

Dei 58 ceppi testati ben 11 sono stati capaci di resistere in queste condizioni estreme e, quindi, sono stati presi in considerazione per le successive prove; la figura 5 mostra i dati ottenuti.

Gli 11 ceppi selezionati hanno mostrato una buona resistenza sia all’etanolo che al pH nei primi 5 giorni, mantenendo una buona carica vitale. Dopo 10 giorni di incubazione e fino a fine prova (15 giorni) i ceppi che hanno mostrato una particolare capacità di adattamento sono: M27, T11, P5, GT1, A1, P5, M28.

Il ceppo commerciale V22 (utilizzato come confronto) è quello che ha resistito meno rispetto agli altri ceppi, sicuramente dovuto alla particolare composizione del terreno, tanto che già dopo 10 giorni di incubazione la carica cellulare è scesa di quattro cicli logaritmici arrivando a fine prova a una completa perdita di vitalità.

Figura 5. Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in Synthetic Wine : pH 3,5 + 14% etanolo

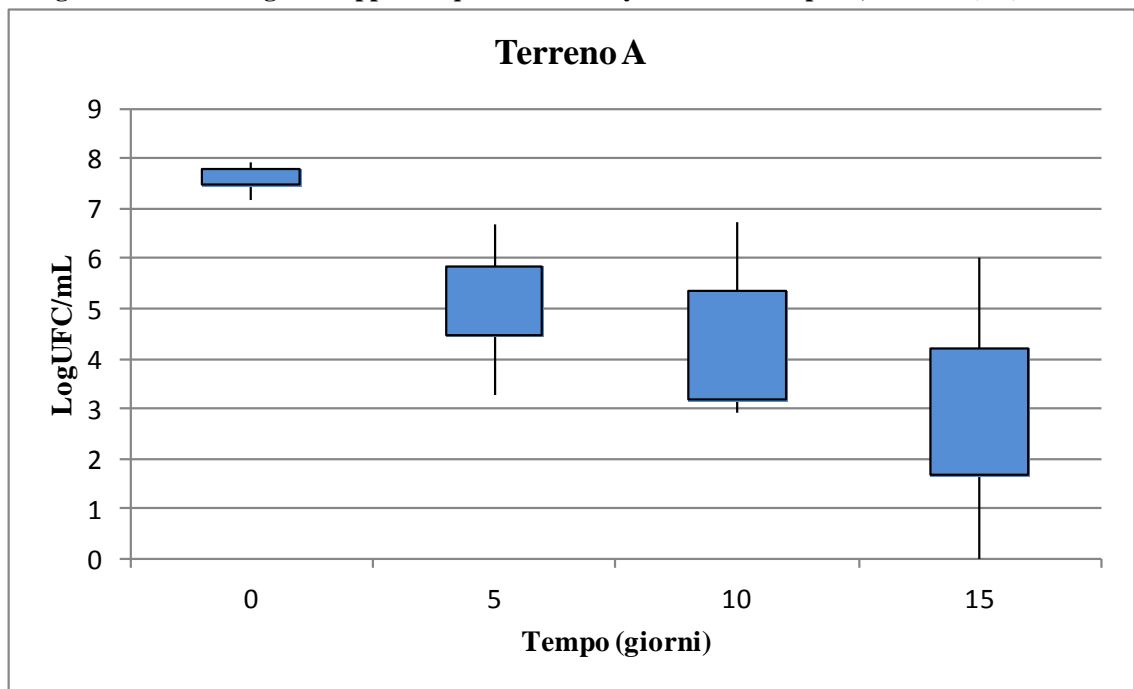


Gli 11 ceppi selezionati sono stati testati nello stesso terreno ma variando il pH e la concentrazione di etanolo. Nelle figure 6 e 7 sono riportati i risultati relativi alle prove effettuate.

Per quanto riguarda la prova effettuata nel Terreno A (figura 6) i ceppi GT1, P6, M27, M29 e T11 hanno mostrato una buona resistenza per tutta la durata della prova, mantenendo una carica cellulare di circa 10^5 UFC/mL. Il ceppo commerciale V22, già dopo 5 giorni di incubazione ha subito una drastica riduzione della carica cellulare arrivando a fine prova (dopo 15 giorni) ad una completa perdita di vitalità.

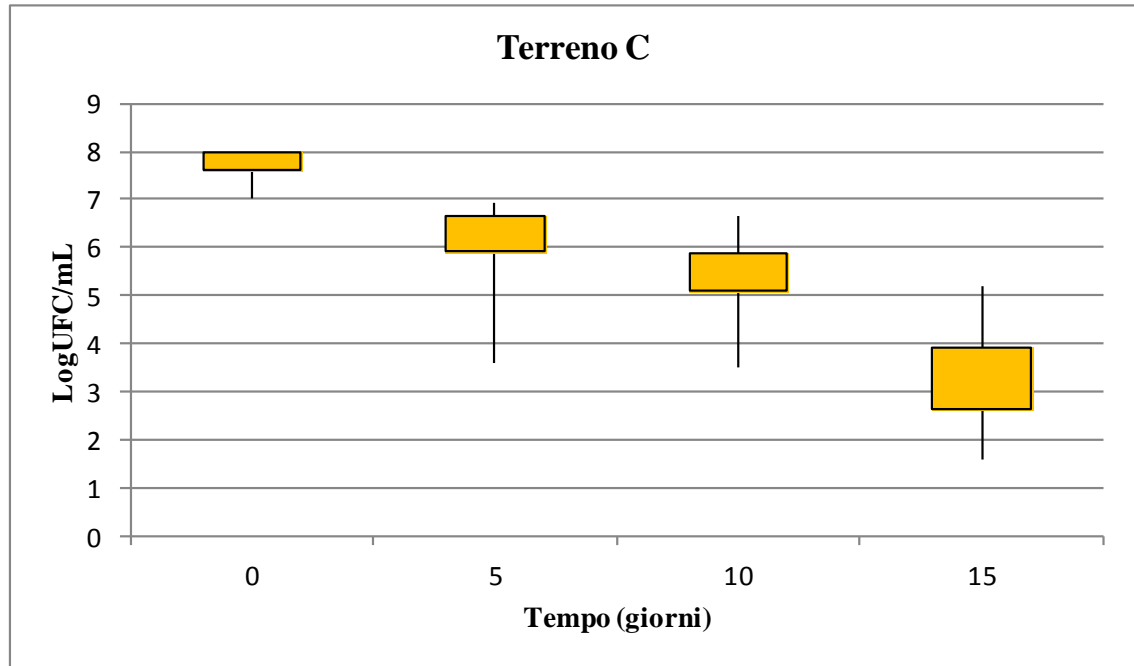
Il comportamento del ceppo commerciale, dovuto al pH notevolmente basso, rispetta le caratteristiche riportate nella scheda tecnica.

Figura 6 Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in Synthetic Wine : pH 3,0 + 10% (v/v) etanolo



Nella figura 7 sono riportati i risultati della prova effettuata nel terreno C, in cui si sono distinti i ceppi P5, P6, GT1, M17 e M27 per la notevole capacità di adattamento. I restanti ceppi (P1, A1, V22, M25, M28, M29 e T11) hanno mostrato maggiori difficoltà di adattamento, in particolare si evidenzia come la maggiore concentrazione di etanolo nel terreno C limiti lo sviluppo dei ceppi M29 e T11, i quali nel terreno A, con un contenuto in etanolo del 10%, hanno mostrato a fine prova una buona carica vitale.

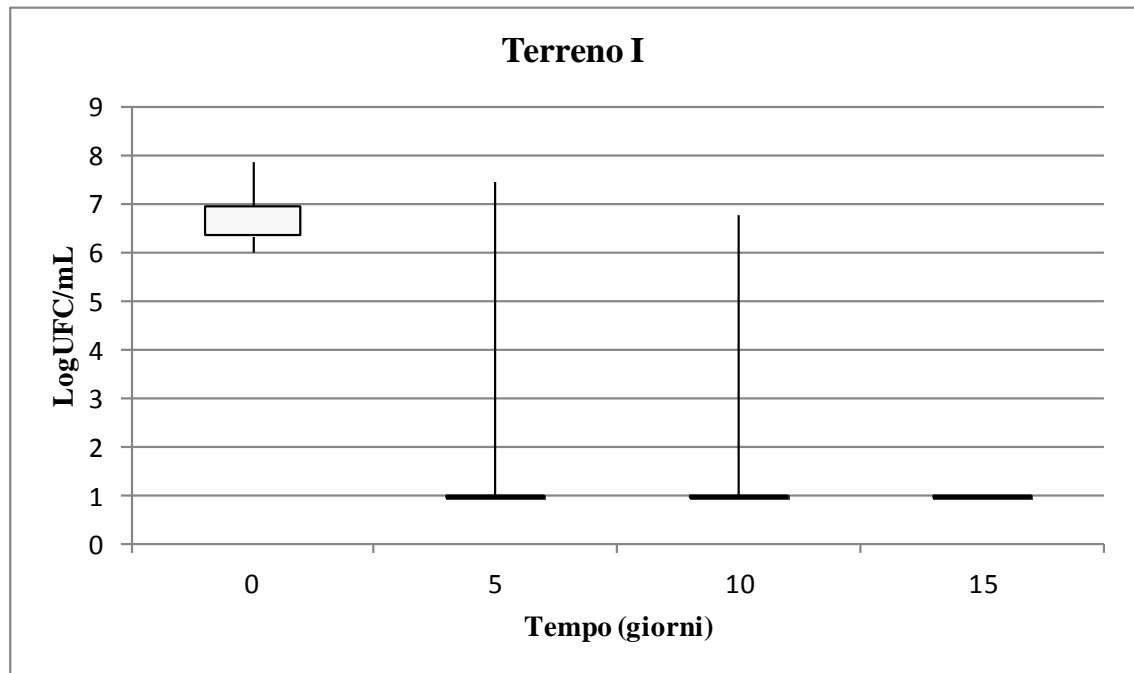
Figura 7 Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in Synthetic Wine : pH 3,2 + 13% (v/v) etanolo



La fase di caratterizzazione tecnologica è proseguita testando i ceppi in terreno synthetic wine variando il pH e le concentrazioni di solforosa, aggiunta come metabisolfito di potassio ($K_2S_2O_5$). I terreni sono stati contraddistinti con le lettere F, G, H, I, L, M, N, O e P. Nei terreni F, G, H, L, M, P i ceppi, appena dopo l'incoculo, hanno avuto una riduzione notevole della loro carica cellulare, tanto che già dopo 5 giorni di incubazione hanno subito una completa perdita di vitalità (dati non mostrati).

La figura 8 mostra la prova di crescita nel terreno I, dove l'unico ceppo che si è differenziato dagli altri, per la sua notevole capacità di adattamento in queste condizioni sfavorevoli, è il GT1. Il ceppo, fino a 10 giorni di incubazione, ha mantenuto una carica cellulare pari a 10^6 UFC/mL. Gli altri ceppi, subito dopo l'inoculo, hanno subito una notevole riduzione della carica cellulare, perdendo la loro vitalità dopo 5 giorni di incubazione. La solforosa in soluzione acquosa va incontro a degli equilibri, la frazione molecolare, che è quella che ha proprietà antimicrobiche, è strettamente legata al pH della soluzione, quindi tanto più basso è il pH, maggiore sarà la frazione di solforosa molecolare che svolge un'azione antimicrobica. Tutto questo ha giocato un ruolo a sfavore dei ceppi testati.

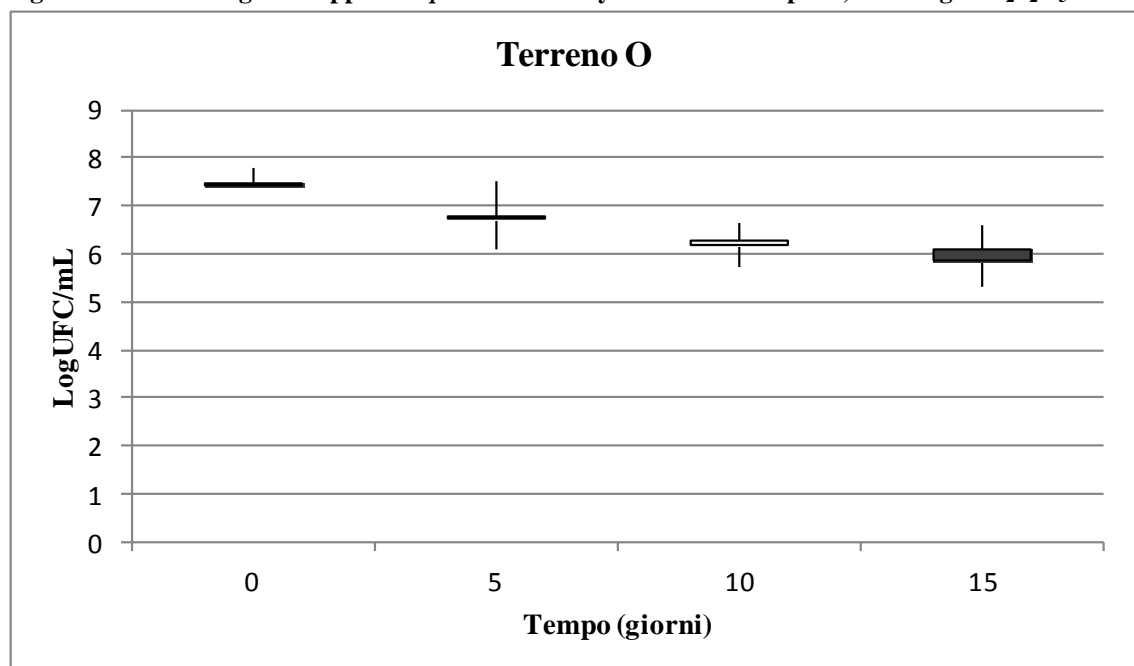
Figura 8 Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in Synthetic Wine : pH 3,2 + 20mg/L $K_2S_2O_5$.



Nella figura 9 sono riportati i risultati della prova di crescita nel terreno O. Tutti i ceppi hanno mostrato una maggiore resistenza rispetto al terreno I, mantenendo una carica cellulare, a fine prova, di circa 10^6 UFC/ml.

Nel terreno O la concentrazione di solforosa è maggiore e anche il pH; quindi la maggiore resistenza è sicuramente dovuta al fatto che essendo il pH più alto, la frazione di solforosa molecolare è minore, quindi minore è anche la sua azione antimicrobica.

Figura 9 Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in Synthetic Wine : pH 3,5 + 50mg/L $K_2S_2O_5$.

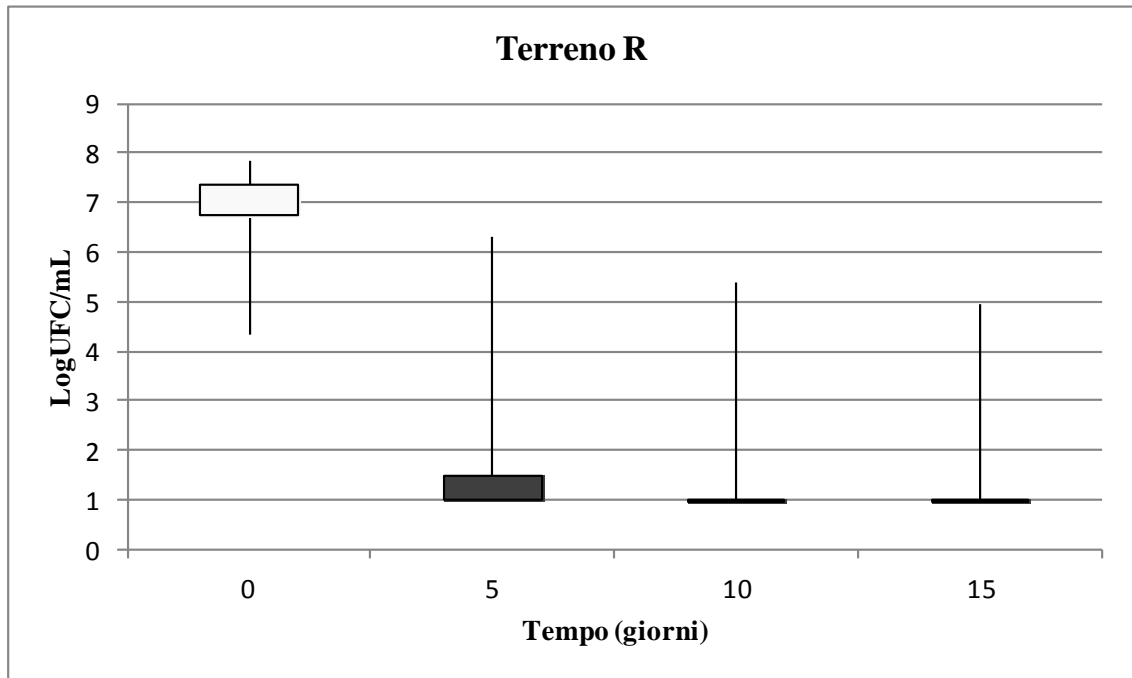


Dai risultati ottenuti nelle precedenti prove, si è scelto di preparare dei terreni combinando i tre parametri: pH, solforosa ed etanolo.

I terreni sono stati contraddistinti con le lettere Q ed R. Nel terreno Q (pH 3,2+20mg/L $K_2S_2O_5$ +13%EtOH) i ceppi, appena dopo l'incoculo, hanno subito una notevole riduzione della carica cellulare tanto che già dopo 5 giorni di incubazione non erano più vitali (dati non mostrati).

Nella figura 10 sono riportati i risultati della prova effettuata nel terreno R. In questo terreno solamente il ceppo GT1 si è differenziato notevolmente dagli altri mostrando una maggiore capacità di adattamento e di resistenza, mantenendo a fine prova, una carica cellulare pari a 10^5 UFC/ml.

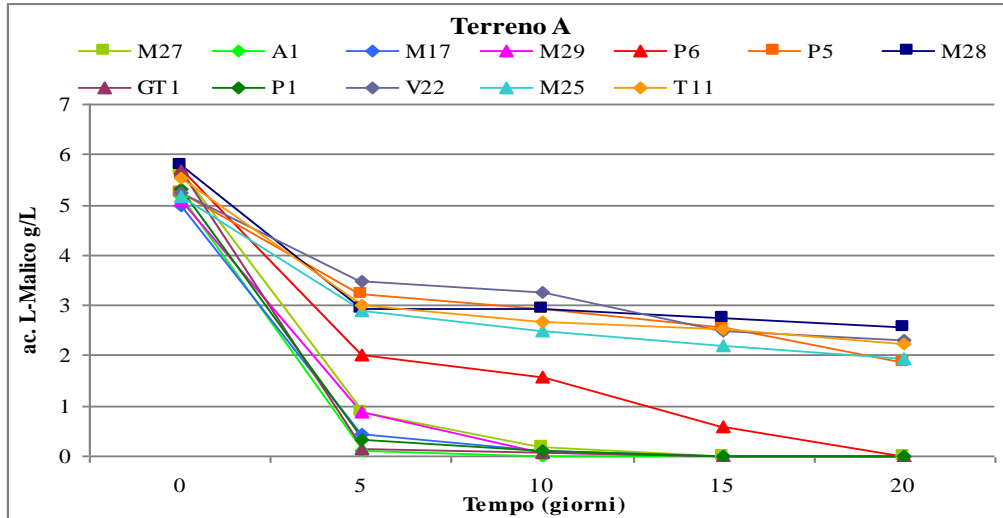
Figura 10 Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in Synthetic Wine : pH 3,5+20 mg/L $K_2S_2O_5$ + 13% (v/v) etanolo



9.6 Metabolismo dell'acido malico

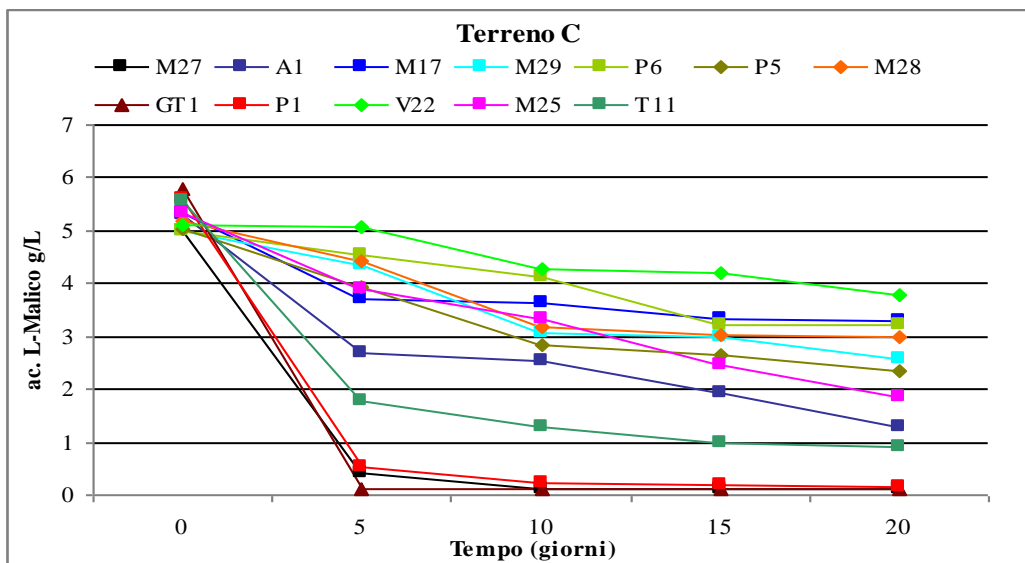
Sugli 11 ceppi di *L. plantarum* è stata, inoltre, valutata la capacità di degradare l'acido L-malico nei terreni A, B, C, D, E. Nei terreni B, D ed E i ceppi hanno mostrato una buona capacità nel metabolizzare il composto, degradandolo completamente a fine prova (20 giorni) (dati non mostrati). Nel terreno A, figura 11, si può notare, che non tutti i ceppi hanno mostrato un comportamento analogo. Nello specifico i ceppi M27, M17, A1, GT1 e P1 sono riusciti dopo soli 5 giorni, a degradare la maggior parte dell'acido malico presente, consumandolo completamente a 15 giorni.

Figura 11 Curve di degradazione ac. L-malico in Synthetic Wine: pH 3,0+10% EtOH(v/v)



Nel terreno C, figura 12, i ceppi M27, GT1 e P1, non risentendo della composizione del terreno, sono riusciti a degradare velocemente (dopo 5 giorni) l'acido malico presente.

Figura 12 Curve di degradazione ac. L-malico in Synthetic Wine : pH 3,2+13% EtOH(v/v)



I restanti ceppi hanno mostrato una notevole difficoltà nel degradare il composto, facendo registrare valori di acido malico ancora molto alti anche dopo 20 giorni di incubazione, molto probabilmente a causa del pH basso e per la presenza del 13% di etanolo.

In particolare, il ceppo commerciale V22 non è riuscito a metabolizzare il composto, confermando che tale ceppo lavora bene solo a pH superiori a 3,5 come riportato nella scheda tecnica.

9.7 MALDI TOF/TOF

Dalla prova di caratterizzazione tecnologica in synthetic wine a pH 3,5 con il 14% di etanolo, dei 58 ceppi di *L. plantarum* testati, ne sono stati selezionati 11, utilizzando come confronto il ceppo commerciale di *L. plantarum* V22 della Lalvin (Lallemend INC.Succ.Italiana).

Prima di procedere con le altre prove è stato effettuato un controllo dei ceppi in collezione, valutando la loro purezza, attraverso l'utilizzo del MALDI TOF/TOF. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 26.

Tabella 26 Risultati MALDI TOF/TOF

Ceppi	Identificazione	Score
A1	<i>L. plantarum</i>	2,245
P1	<i>L. plantarum</i>	2,433
P5	<i>L. plantarum</i>	2,341
P6	<i>L. plantarum</i>	2,533
GT1	<i>L. plantarum</i>	2,395
M17	<i>L. plantarum</i>	2,409
M25	<i>L. plantarum</i>	2,247
M27	<i>L. plantarum</i>	2,417
M28	<i>L. plantarum</i>	2,233
M29	<i>L. plantarum</i>	1,962
T11	<i>L. plantarum</i>	2,205
V22	<i>L. plantarum</i>	2,249

Come si può notare dai risultati ottenuti, tutti i ceppi sono risultati essere puri, quindi confermando che la collezione non ha subito contaminazioni durante il loro utilizzo.

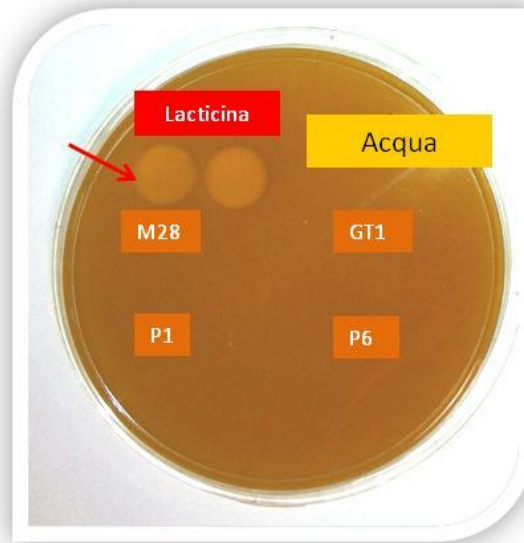
9.8 Produzione di batteriocine

La valutazione della capacità degli 11 ceppi di *L. plantarum* di produrre batteriocine, è stata effettuata mediante saggio in piastra (tecnica drop diffusion-agar test), e mediante MALDI TOF/TOF.

Con l'impiego di entrambe le tecniche si è visto che nessun ceppo è risultato produttore di batteriocine.

La figura 13 mostra, a titolo di esempio, una piastra ottenuta con la tecnica drop diffusion-agar test.

Figura 13 Piastra con tecnica drop diffusion-agar test

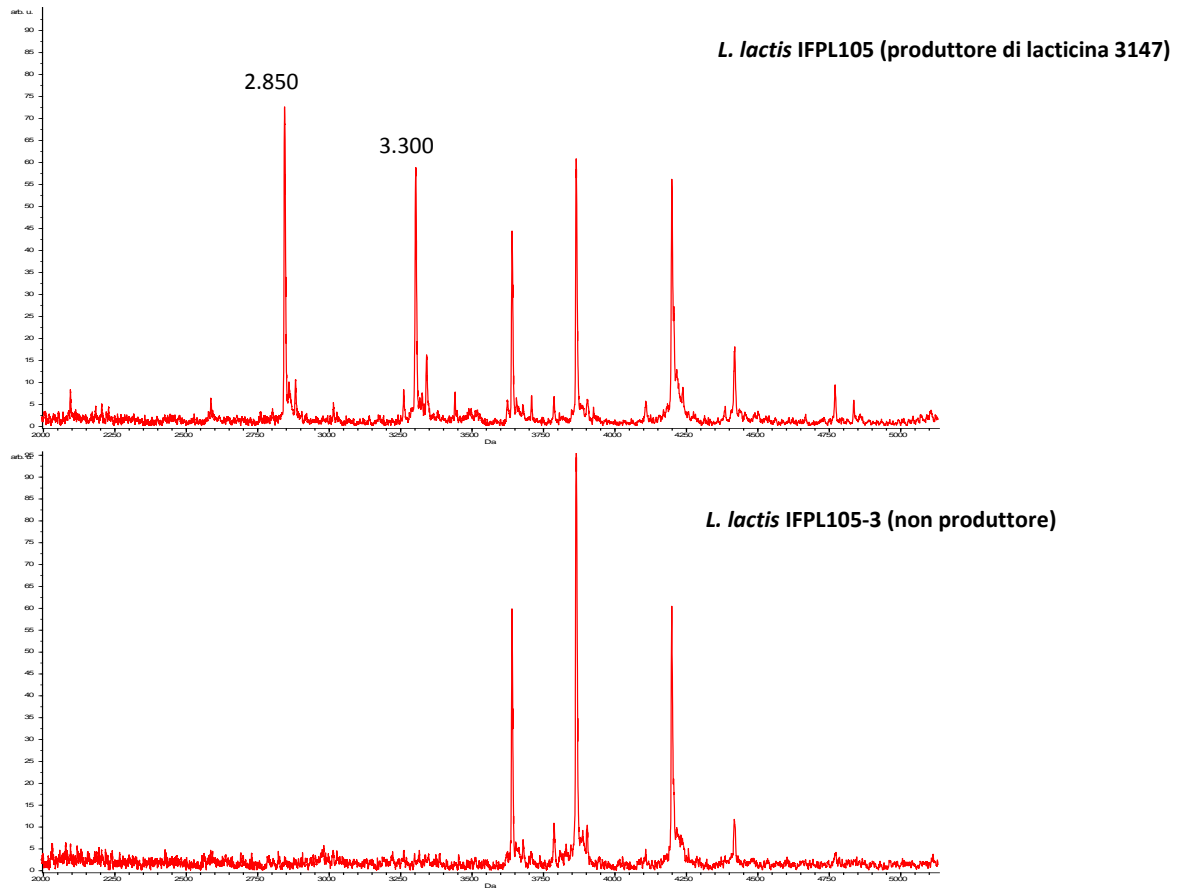


Come si può notare in figura, è possibile osservare la comparsa del caratteristico alone di inibizione solo per la lacticina 3147, utilizzata come controllo. Nessuno degli 11 ceppi testati ha mostrato alone di inibizione.

Nella figura 14 è riportato un esempio di spettri di massa, ottenuti mediante l'impiego del MALDI TOF/TOF, di due ceppi isogenici di *Lactococcus lactis* IFPL105, i quali si differenziano per la produzione di una batteriocina con due subunità (i due picchi mostrati in figura, a 2850Da e 3300Da). Dall'analisi dei grafici si nota che nel ceppo non produttore non compaiono i due picchi, che invece sono presenti nel ceppo produttore.

Gli 11 ceppi di *L. plantarum* testati, compreso il ceppo commerciale V22, hanno mostrato degli spettri di massa in cui non sono comparsi picchi caratteristici (dati non mostrati), come nel caso sopra citato, possiamo affermare perciò, che sono tutti non produttori di batteriocine, a conferma dei risultati ottenuti mediante tecnica drop diffusion-agar.

Figura 14 Profilo di due ceppi isogenici di *L.lactis*



9.9 Produzione di ammine biogene

Sugli 11 ceppi di *L. plantarum* è stata valutata la capacità o meno di produrre ammine biogene, come controllo è stato utilizzato il ceppo commerciale V22, il quale, come specificato nella scheda tecnica, risulta non produttore di ammine.

Per lo studio ci si è avvalso di due metodiche analitiche, mediante l'impiego di un terreno di coltura specifico e mediante RP-HPLC.

La prima determinazione è stata effettuata utilizzando uno specifico terreno di coltura addizionato dell'1% dei relativi amminoacidi precursori (metodo qualitativo).

Un risultato positivo è dato dal viraggio di colore del terreno da marrone a viola; per la tirosina, invece, si ha la comparsa di un alone di chiarificazione.

Tutti i ceppi testati, compreso il ceppo commerciale V22, sono risultati non produttori di istamina, tiramina, putrescina, feniletilamina e cadaverina.

Successivamente, è stata effettuata un'analisi dei ceppi mediante RP-HPLC con rivelatore a fluorescenza (metodo quantitativo).

Per la prova i ceppi sono stati inoculati in MRS broth contenente i diversi amminoacidi precursori.

E' stato effettuato, in primo luogo, un conteggio vitale in piastra (MRS agar), per stimare la carica cellulare di partenza; dal conteggio si è visto che questa era compresa in un range compreso tra 1.1×10^8 e 3.2×10^8 UFC/mL.

Questa prima fase è molto importante perché ha permesso di avere un inoculo con la stessa carica cellulare per tutti i ceppi testati.

Per ogni ceppo sono stati ottenuti dei cromatogrammi dai quali è stato possibile valutare i tempi di ritenzione e la relativa comparsa dei picchi, e nell'eventualità stimare la concentrazione dell'ammina prodotta.

Integrando i risultati ottenuti con quelli dello standard e del controllo si è visto che nessun ceppo è risultato produttore di istamina, tiramina, putrescina, fenilettilamina e cadaverina.

I dati ottenuti mediante RP-HPLC hanno quindi confermato i risultati ottenuti con l'utilizzo del terreno di coltura.

Nelle figure 15, 16 e 17 sono riportati, come esempio, i cromatogrammi del ceppo M28 relativi alle principali ammine che possono ritrovarsi nel vino, ovvero: tiramina, istamina e putrescina.

Nella figura 15 è riportato il cromatogramma relativo alla produzione di istamina.

Come si può notare dal grafico al tempo di ritenzione corrispondente all'istamina non c'è la comparsa del picco, infatti facendo un confronto anche con lo standard ed il controllo si può dedurre che il ceppo M28 è non produttore di istamina.

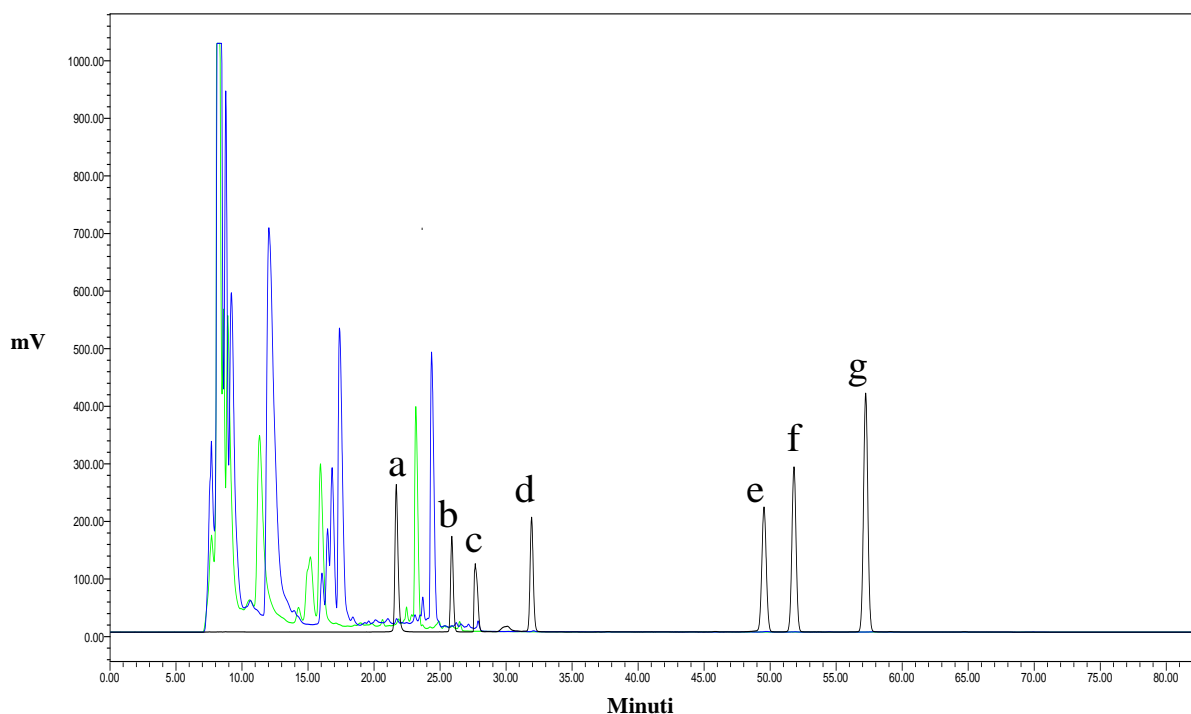


Figura 15 Cromatogramma del ceppo *L. plantarum* M28 relativo alla produzione di istamina

In nero è riportato il cromatogramma che mostra i picchi relativi alle ammine biogene utilizzate, le lettere indicano, nello specifico: a) Istamina; b) metilamina; c) etilamina d) tiramina; e) fenilettilamina; f) putrescina; g) cadaverina. In blu è ripottrato il cromatogramma del ceppo M28 inoculato in MRS con aggiunta di istidina. In verde è riportato il cromatogramma relativo al controllo costituito dal terreno MRS con aggiunta di istidina, senza il ceppo batterico.

Nella figura 16 è riportato il cromatogramma relativo alla produzione di tiramina. Come si può notare dal grafico al tempo di ritenzione corrispondente alla tiramina non c'è la comparsa del picco, infatti facendo un confronto anche con lo standard ed il controllo si può dedurre che il ceppo M28 è non produttore di tiramina.

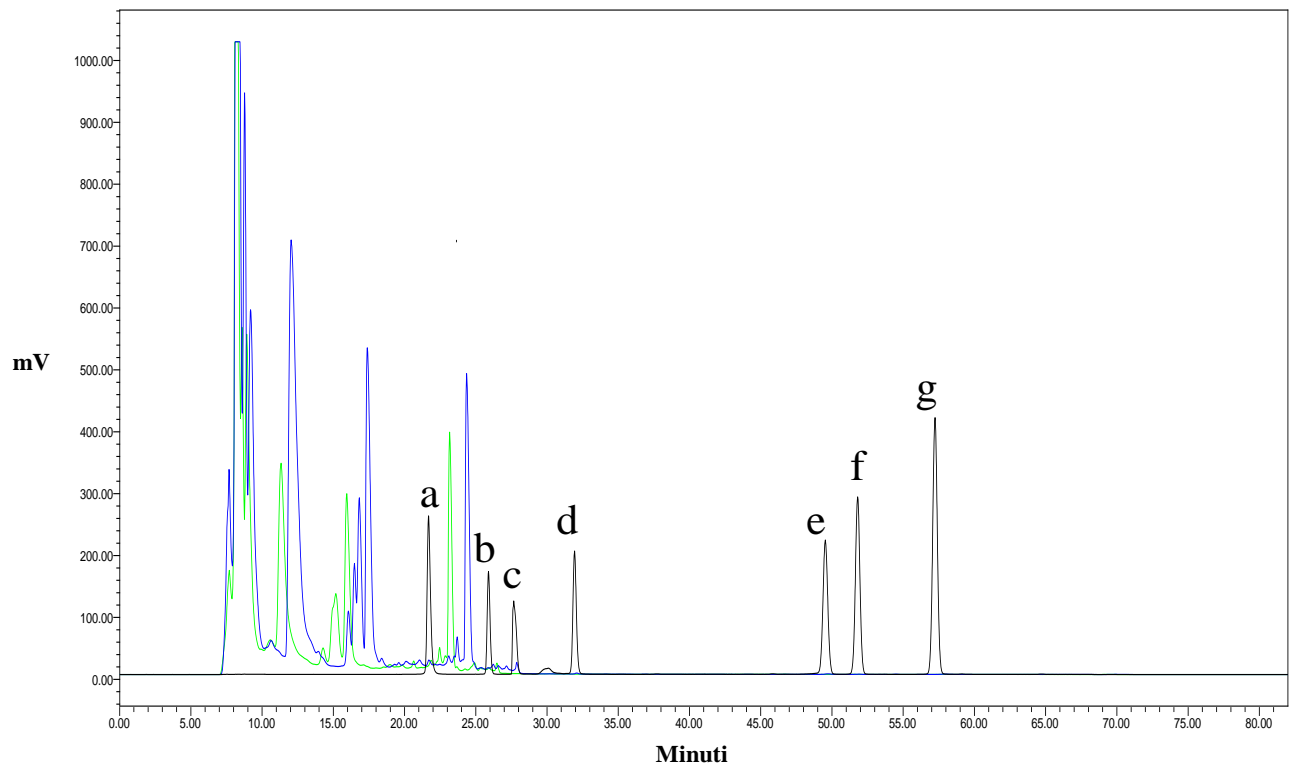


Figura 16 Cromatogramma del ceppo *L. plantarum* M28 relativo alla produzione di tiramina

In nero è riportato il cromatogramma che mostra i picchi relativi alle ammine biogene utilizzate, le lettere indicano, nello specifico: a) istamina; b) metilamina; c) etilamina d) tiramina; e) feniletilamina; f) putrescina; g) cadaverina. In blu è ripottrato il cromatogramma del ceppo M28 inoculato in MRS con aggiunta di tirosina. In verde è riportato il cromatogramma relativo al controllo costituito dal terreno MRS con aggiunta di tirosina, senza il ceppo batterico.

Nella figura 17 è riportato il cromatogramma relativo alla produzione di putrescina. Anche in questo caso come si può notare dal grafico al tempo di ritenzione corrispondente alla putrescina non c'è la comparsa del picco, infatti facendo sempre un confronto con lo standard ed il controllo si può dedurre che il ceppo M28 è anche non produttore di putrescina.

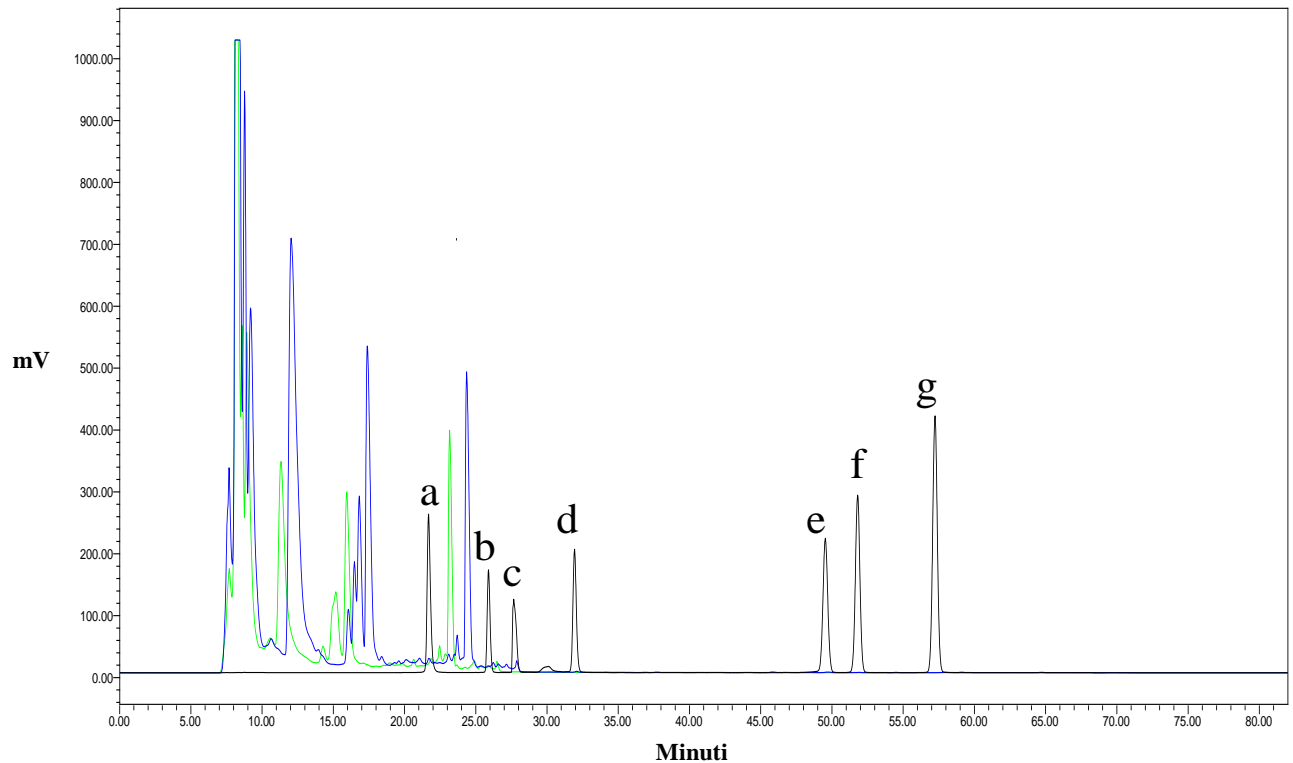


Figura 17 Cromatogramma del ceppo *L. plantarum* M28 relativo alla produzione di putrescina

In nero è riportato il cromatogramma che mostra i picchi relativi alle ammine biogene utilizzate, le lettere indicano, nello specifico: a) Istamina; b) metilamina; c) etilamina d) tiramina; e) feniletilamina; f) putrescina; g) cadaverina. In blu è ripottrato il cromatogramma del ceppo M28 inoculato in MRS con aggiunta di ornitina. In verde è riportato il cromatogramma relativo al controllo costituito dal terreno MRS con aggiunta di ornitina, senza il ceppo batterico.

9.10 Effetti di malvin-3,5-diglucoside sulla crescita dei ceppi di *L. plantarum*

La valutazione dell'effetto del composto fenolico malvin 3,5-diglucoside sulla crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* è stata fatta in terreno MRS broth pH 3,5 addizionato con diverse concentrazioni del composto: 0.5 mg/L, 0.25 mg/L e 0.125 mg/L.

Nella tabella 27 sono riportati i ceppi testati, le varie concentrazioni del composto utilizzato, i valori ottenuti intesi come percentuale di crescita e la relativa analisi statistica dei risultati.

Tabella 27 Crescita degli 11 ceppi di *L. plantarum* in presenza di malvin-3,5-diglucoside

Ceppi <i>L. plantarum</i>	Concentrazioni malvidin-3,5-diglucoside		
	0,5mg/L	0,25mg/L	0,125mg/L
A1	-18.4 (±6.0)	-18.9 (±8.4)	-20.8 (±8.4)
GT1	95.5a (±11.2)	75.6b (±6.1)	69.9b (±1.1)
M17	-25.3c (±2.88)	-21.4b (±2.7)	-17.3a (± 2.5)
M25	-5.91 (±1.36)	-5.85 (±1.59)	-6.73 (± 1.13)
M27	-6.48 (±0.179)	-7.78 (±1.57)	-6.94 (±3.21)
M28	95.1 (±21.2)	72.6 (±11.7)	5.82 (±14.4)
M29	-14.0b (±1.6)	-9.16ab (±1.90)	-4.13a (±3.84)
P1	-3.98 (±2.49)	-1.49 (±0.96)	-1.61 (±0.79)
P5	-55.5 (±2.02)	-50.2 (±0.5)	-42.5 (±8.6)
P6	19.9a (±14.2)	6.01a (±10.90)	-19.5b (±4.0)
T11	-9.52 (±3.79)	-15.6 (±0.6)	-10.9 (±2.4)
V22 c.c.	20.0a (±1.9)	-10.7b (±5.8)	-28.9c (±4.6)

Le lettere a,b,c indicano valori significativamente differenti ($p < 0,05$).

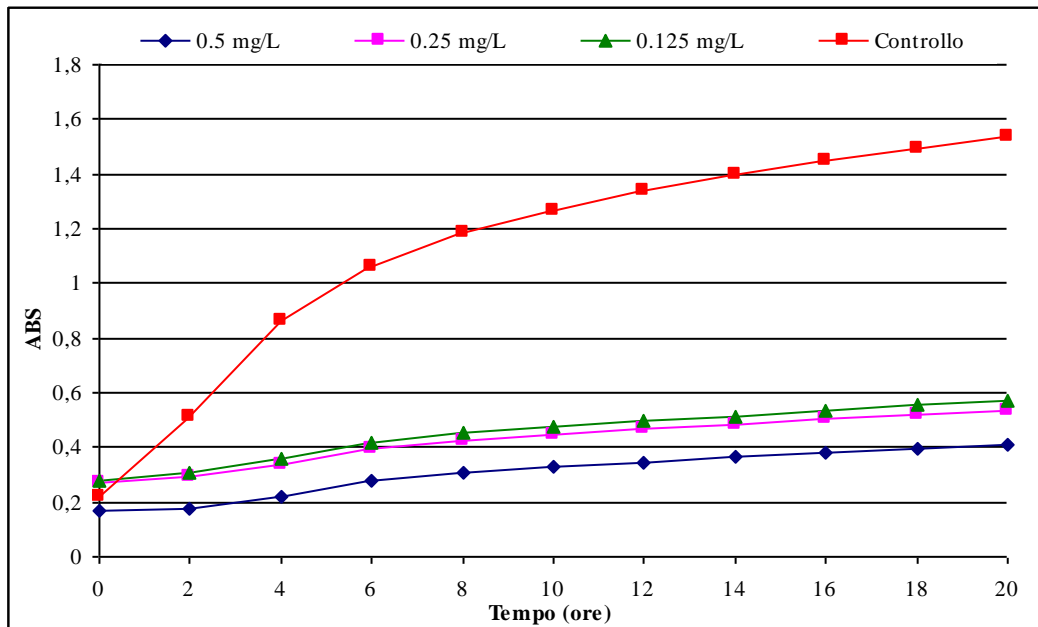
Il simbolo positivo (+) indica che la crescita è stimolata dal composto invece il simbolo negativo (-) indica che la crescita è inibita; inoltre per stimolo o inibizione sono considerati i valori con una percentuale del $\pm 10\%$.

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il metodo “one-way Analysis of variance (ANOVA).

Nelle figure 18, 19 e 20, sono riportati i dati più significativi, ovvero gli andamenti della crescita espressa come assorbanza (ABS) nel tempo (ore), rispettivamente, dei ceppi P5, GT1 ed M25.

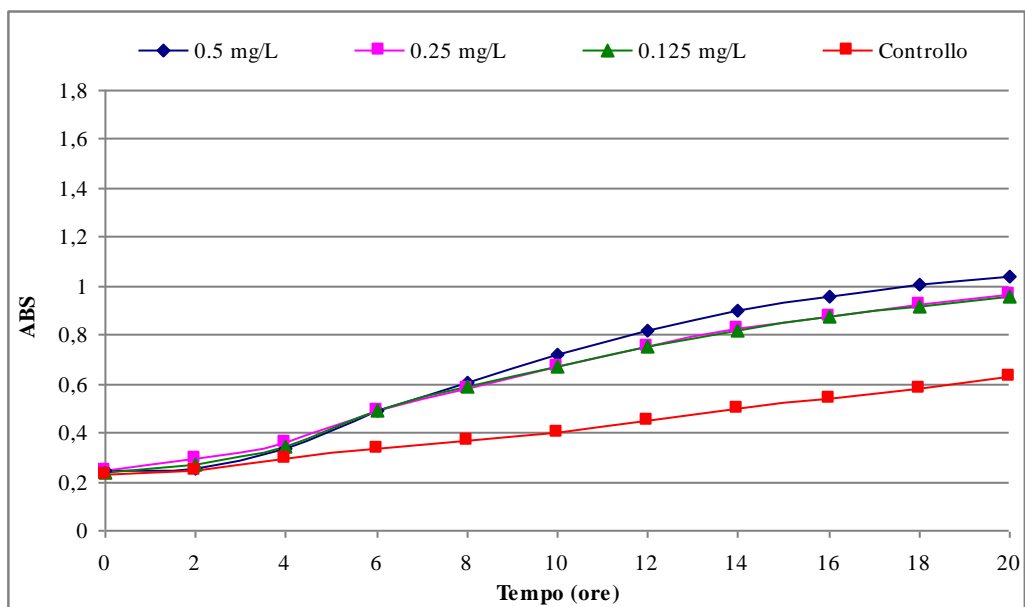
Nel caso del ceppo P5 il composto inibisce la crescita, infatti, come mostra il grafico (figura 18), a concentrazione maggiore del composto (0,5 mg/L) la crescita diminuisce notevolmente, comparandolo con il controllo costituito dal terreno inoculato con il ceppo però privo del composto malvin 3,5-diglucoside.

Figura 18 Crescita di *L. plantarum* P5 in presenza di malvin 3,5-diglucoside



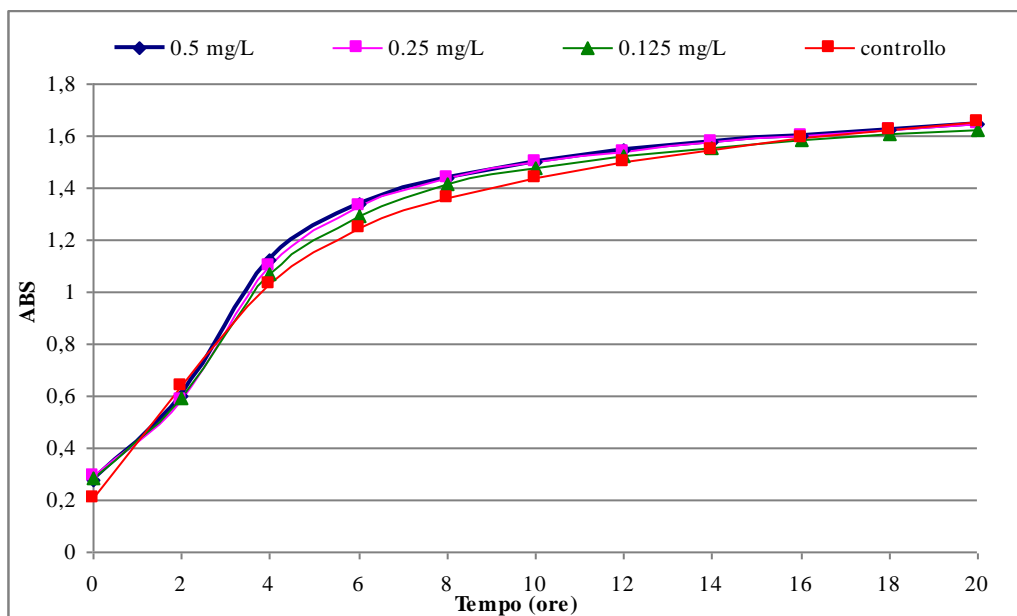
La crescita del ceppo GT1, come è possibile notare nel grafico (figura 19), è stimolata in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione del composto.

Figura 19 Crescita di *L. plantarum* GT1 in presenza di malvin 3,5-diglucoside



L'andamento della crescita del ceppo M25 (figura 20) mostra come la presenza del composto, alle tre diverse concentrazioni, non abbia alcun effetto sulla sua crescita.

Figura 20 Sviluppo di *L. plantarum* M25 in presenza di malvin 3,5-diglucoside



9.11 Analisi dell'attività glucosidasica

9.11.1 Capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico commerciale (n-octylglucoside)

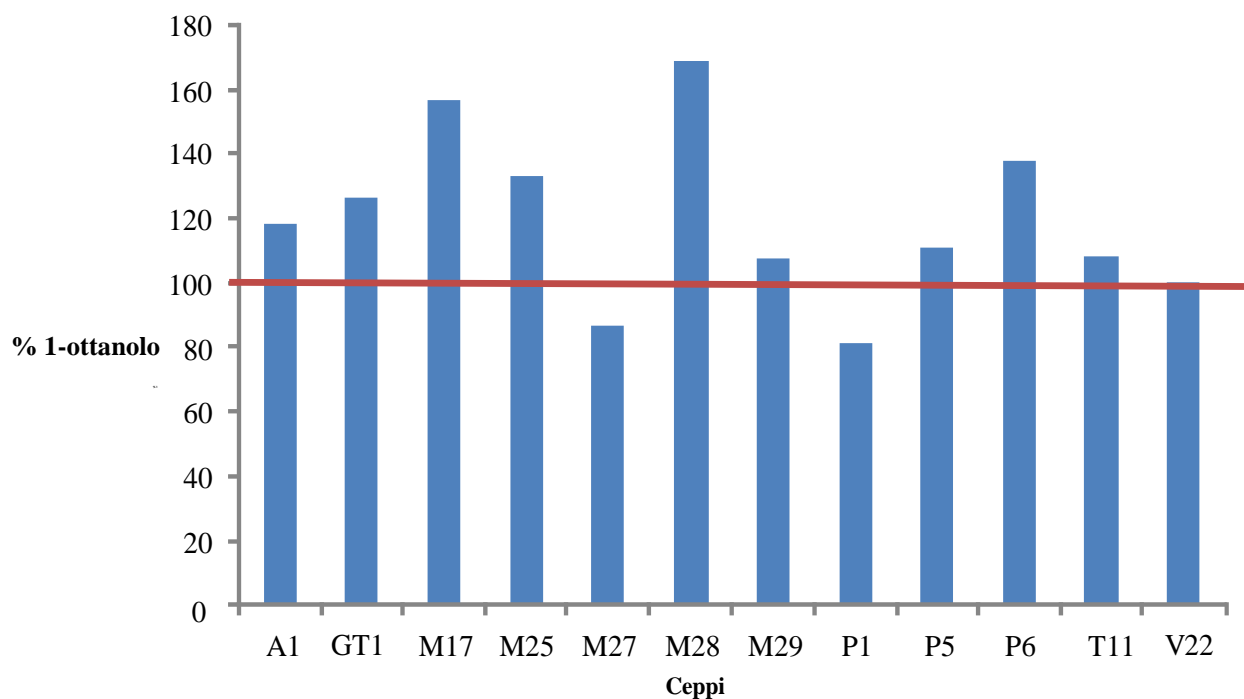
E' stata valutata la capacità degli 11 ceppi di *L. plantarum* nell'idrolizzare un precursore aromatico commerciale. Per la prova i ceppi sono stati posti a contatto con 5ppm del precursore n-octylglucoside (Sigma Aldrich) ed è stata valutata la liberazione del corrispondente aglicone 1-ottanolo al tempo 0 ore mediante sistema HS-SPME-GC-MS. Nella tabella 28 è riportata la media dei dati APAs (area assoluta dei picchi) ottenuta e la relativa deviazione standard, per ogni ceppo batterico testato.

Tabella 28 Risultati idrolisi n-octylglucoside

Ceppi	Media	Deviazione standard
Controllo	0	0
A1	1374998	182665,5
GT1	1470788	223690,4
M17	1829973	99960,9
M25	1553906	18674,7
M27	1008714	29482,8
M28	1968063	2923,2
M29	1251023	71640,5
P1	947318	78966,9
P5	1291737	80423,5
P6	1605336	39610,7
T11	1260150	30652,4
V22	1164974	25510,3

Nella Figura 21 è riportata in grafico la percentuale di 1-ottanolo prodotto dai ceppi di *L. plantarum* in seguito all'idrolisi del composto n-octylglucoside. Come controllo è stato utilizzato il terreno MRS contenente il precursore aromatico e senza la coltura batterica, inoltre come confronto è stato utilizzato il ceppo commerciale V22 e anche due ceppi batterici, descritti precedentemente, che non hanno attività glucosidasica, ovvero il ceppo 85 (*Pediococcus pentosaceus*) e il ceppo 94 (*Lactobacillus paracasei*) (dati non mostrati in grafico).

Figura 21 Produzione 1-ottanolo da n-octylglucoside.



Come si può notare dal grafico, tutti i ceppi sono stati capaci di idrolizzare il composto, e la maggior parte di loro: A1, GT1, M17, M25, M28, M29, P5, P6 e T11 hanno prodotto un rilascio di 1-ottanolo più elevato rispetto al ceppo commerciale V22; in particolare, il ceppo che si è notevolmente differenziato dagli altri per la sua spiccata attività glucosidasi è *L. plantarum* M28.

9.11.2 Capacità dei ceppi di *L. plantarum* nel rilascio di composti volatili liberi da precursore aromatico estratto da uva

E' stata valutata la capacità degli 11 ceppi di *L. plantarum* nell'idrolizzare un precursore aromatico (naturale) estratto da uva.

I ceppi sono stati posti a contatto con il precursore glucosidico, ed è stata effettuata l'analisi dei corrispondenti agliconi, provenienti dall'idrolisi del composto, al tempo 0 ore 2 ore e 24 ore, mediante sistema HS-SPME-GC-MS.

Nella tabella 29 sono riportati i risultati dei composti aromatici prodotti con la relativa media e la deviazione standard.

Tabella 29 Composti aromatici prodotti dall'idrolisi del precursore

Composti aromatici	Media	Deviazione standard
Terpeni		
limonene	4484,5	3456,4
linalolo	67105,2	35465,5
cis-linalolo ossido	132768,6	145788,3
trans-linalolo ossido	41021,5	84764,9
β -mircene	9428,7	4909,4
Alcol C6		
1-esanolo	53607,6	27762,6
trans-2-esene-1-olo	12377,4	8892,0
Fenoli volatili e derivati benzenici		
alcol β -feniletico	13323,9	8496,4
alcol benzilico	13662,0	9002,6

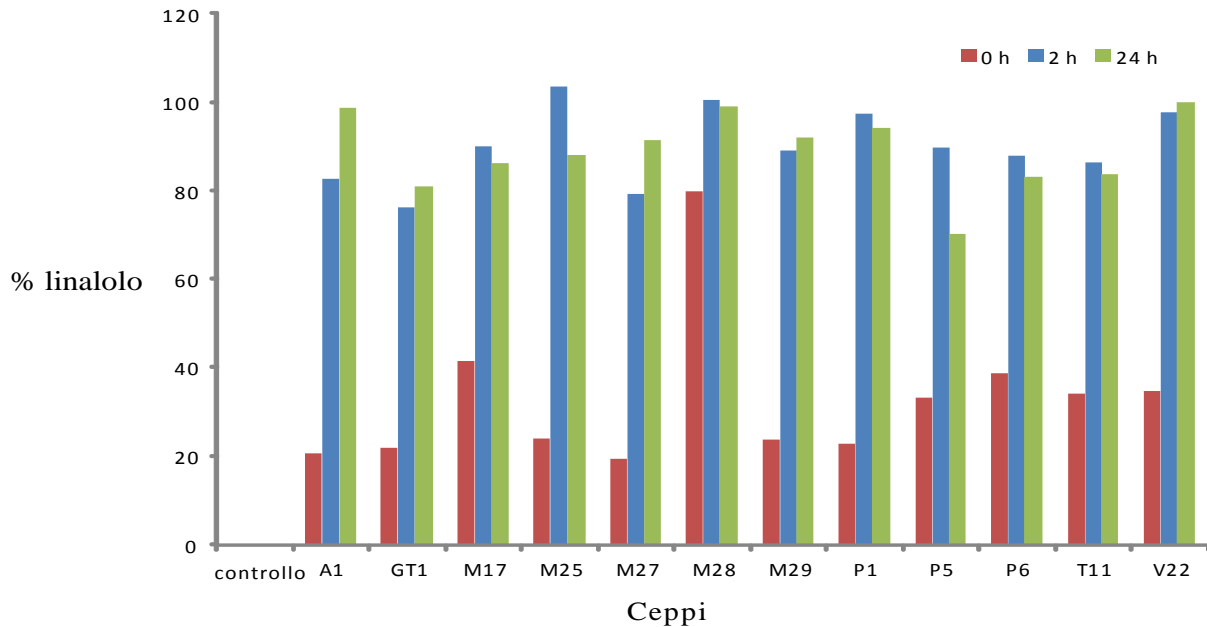
Come si può notare dalla tabella i composti aromatici rilasciati dal precursore appartengono a differenti composti chimici ed alcuni di essi, come i terpeni, sono degli importanti composti odorosi i quali conferiscono ai vini sfumature aromatiche di floreale.

L'utilizzo dei dati APAs (area assoluta dei picchi) per esprimere il rilascio di composti aromatici è sufficiente per questo tipo di analisi, poiché l'obiettivo del lavoro era di confrontare la capacità di idrolisi da parte dei ceppi di *L. plantarum* sul precursore aromatico estratto da uva.

Nella figura 22 è riportato in grafico la produzione di linalolo al tempo 0 ore, 2 ore e 24 ore.

L'attenzione è stata focalizzata su questo composto terpenico perché rappresenta uno dei composti aromatici più caratteristici presenti nell'uva. Il linalolo è il composto più attivo dal punto di vista sensoriale, inoltre presenta una soglia di percezione odorosa molto bassa oltre ad essere anche il più rappresentato.

Figura 22 Produzione di linalolo dagli 11 ceppi di *L. plantarum*



Come si può notare nel grafico, il ceppo che ha prodotto la maggiore concentrazione del composto in un tempo brevissimo è l'M28; infatti l'80% di linalolo è stato prodotto al tempo 0 ore, ovvero appena dopo l'inoculo, questo può essere tradotto in un vantaggio tecnologico e un risparmio economico, mediante l'impiego di questo ceppo per la fermentazione malolattica e quindi per l'affinamento dei vini.

Per la prova come controllo è stato utilizzato il terreno di coltura MRS contenente il precursore aromatico senza la coltura batterica; come ci si aspettava sia al tempo 0 ore, 2 ore e 24 ore la concentrazione è rimasta pari a zero confermando quindi positivi i dati ottenuti dalla prova.

Agli altri tempi di incubazione considerati per l'analisi, a 2 ore e 24 ore, la produzione è stata più o meno equilibrata per tutti i ceppi.

Il risultato ottenuto da questo studio è stato molto interessante, perché ha confermato che alcuni ceppi, e in particolare l'M28, sono dotati di una buona attività enzimatica riuscendo a lavorare bene sia su un precursore sintetico, come sopra riportato, e anche su un precursore del tutto naturale; aspetto di peculiare importanza perché tali ceppi sono potenzialmente in grado di esprimere tale capacità anche direttamente nel mezzo da cui sono stati isolati ovvero il vino.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha permesso di ottenere una collezione di 58 ceppi di *L. plantarum* di interesse enologico.

Le prove di caratterizzazione fenotipica e l'utilizzo delle gallerie API50 CHL ha consentito di giungere ad una preliminare identificazione degli isolati in esame. Da un totale di 184 isolati, con il test fermentativo, sono stati identificati 22 ceppi batterici come *L. brevis* e 58 ceppi come *L. plantarum*.

L'identificazione dei 58 ceppi di *L. plantarum* è stata confermata mediante analisi PCR-DGGE e sequenziamento del gene che codifica per il 16S rRNA; di seguito i ceppi sono stati biotipizzati mediante RAPD-PCR da cui è emerso che c'è una forte relazione tra i diversi cluster ottenuti e la tipologia di vino.

Dei 58 ceppi identificati, sono stati selezionati, per le ulteriori prove, solamente 11, ovvero quelli migliori da un punto di vista tecnologico.

La caratterizzazione tecnologica ha evidenziato la capacità degli undici ceppi selezionati di adattarsi e sviluppare bene a bassi valori di pH; inoltre di particolare interesse applicativo appare l'elevata alcol tolleranza e per alcuni ceppi anche la buona resistenza alla SO₂.

Lo studio del metabolismo dell'acido malico ha evidenziato la notevole capacità di alcuni ceppi nel degradare l'acido L-malico in maniera completa e in un tempo molto breve.

Altro aspetto importante, evidenziato da questo lavoro, è che gli undici ceppi sono risultati tutti non produttori di ammine biogene.

Per quanto concerne la produzione di batteriocine nessun ceppo è stato in grado di produrle, nemmeno il ceppo commerciale V22 anche se nella scheda tecnica, sopra riportata, era evidenziato che poteva risultare potenzialmente produttore di batteriocine.

Per quanto riguarda lo studio dell'effetto del composto fenolico (malvin 3,5-diglucoside) sulla crescita dei ceppi di *L. plantarum*, ha portato a risultati interessanti; perché la malvin 3,5-diglucoside, come anche altri fenoli, influenza lo sviluppo e il metabolismo dei batteri malolattici.

I risultati dell'attività glucosidasi hanno evidenziato che i ceppi sono in possesso di una buona attività enzimatica (glucosidasi); in modo particolare si è contraddistinto il ceppo M28.

Nella maturazione dei vini rossi, l'azione demalicante svolta da batteri lattici vigorosi e in possesso di una buona attività glucosidasi contribuirebbe al miglioramento compositivo e qualitativo del prodotto poiché in grado di rilasciare monoterpeni volatili determinanti nella definizione delle caratteristiche organolettiche del vino.

La ricerca proseguirà, nel testare direttamente i migliori batteri in diverse cantine, che hanno dato la piena disponibilità, saggiandone le potenzialità su vini ottenuti da diverse varietà di uva.

BIBLIOGRAFIA

- Ababouch L, Afilal ME, Bena bdeljelil H (1991). Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. *Int J Food Sci Technol* **26**: 297-306.
- Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Bar B, Weil JA (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem* **84**: 551-562.
- Andrighetto C, Marcazzan G, Lombardi A (2004). Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett Appl Microbiol* **38**: 400-405.
- Andrighetto C, Zampese L, Lombardi A (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett Appl Microbiol* **33**: 26-30.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **20**: 5137-5142.
- Arena ME, Manca de Nadra MC (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J Appl Microbiol* **90**: 158-162.
- Askar A, Terptow H (1986). Biogene Amine in Lebensmitteln. Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. Eugen Ulmer GmbH and Co., Stuttgart, Germany.
- Ayres JC, Mundt JO, Sandine WE (1980). Microbiology of Foods. W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA, p. 543.
- Bae S, Fleet GH, Heard GM (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* **100**: 712-727.
- Barbagallo RN, Spagna G, Palmieri R, Torriani S (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb Tech* **34**: 292-296.
- Bardóc S (1993). The role of dietary polyamines. *Eur J Clin Nutr* **47**: 683-690.
- Bartowsky E (2009). Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett Appl Microbiol* **48**: 149-156.
- Baumes R (2009). Wine aroma precursors. In: Moreno-Arribas MV, Polo MC. Wine chemistry and biochemistry. Springer, New York.
- Ben Amor K, Vaughan EE, de Vos WM (2007). Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *J Nutr* **137**: 741-747.

Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Delfederico L, La Hens DV, Caballero A, Semorile L (2013). Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microb Biot* **29**: 1537-1549.

Brink BT, Damink C, Joosten HJ, Huis in't Veld H (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in food. *Int J Food Microbiol* **11**: 73-84.

Britz TJ, Tracey RP (1990). The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol* **68**: 23-31.

Celano GV, Cafarchia C, Buja F, Tiecco G (1992). Ricerca di amine biogene in alcuni formaggi. *Ind Aliment* **31**: 764-768.

Carreté R, Vidal MT, Bordons A, Costantì M (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett* **211**: 155-159.

Catzeddu P, Mura E, Parente E, Sanna M, Farris GA (2006). Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Syst Appl Microbiol* **29**: 138-144.

Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, Mc Corrister SJ, Chong P, Wylie J, Van Caesele P, Tabor HA, Snarr P, Gilmour MW, Taboada EN, Westmacott GR.(2013).Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J Microbiol Meth* **94**: 180–191.

Cocconcelli PS, Porro D, Galantini S, Sennini L (1995). Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett Appl Microbiol* **21**: 376-379.

Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5113-5121.

Coppola R, Nanni M, Succi M, Sorrentino E, Iorizzo M, Chiaveri C, Grazia L (2001). Enumeration of thermophilus lactic acid bacteria in ripened cheeses manufactured from raw milk. *Milchwissenschaft* **56**: 140-142.

Coton E and Coton M (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J Microbiol Meth*, **63**: 296-304.

Couto J.A, Campos F.M, Figueiredo A.R, Hogg T.A (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am J Enol Vitic* **57**: 166-171.

Curiel JA, Muñoz R, López de Felipe F (2010a). pH and dose-dependent effects of quercetin on the fermentation capacity of *Lactobacillus plantarum*. *LWT - Food Sci Technol* **43**: 926-933.

Delfini C, Morsiani MG (1992). Resistance to sulphur dioxide of malolactic strains of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus* isolated from wine. *Sci aliment* **12**: 493.

De Vuyst L, Camu N, De Winter T, Vandemeulebroecke K, Van de Perre V, Vancanneyt M, De Vos P, Cleenwerck I (2008). Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int J Food Microbiol* **125**: 79–90.

Díaz-Cinco ME, Fraijo G, Grajeda P, Lozano-Taylor J, Gonzáles de Mejía E (1992). Microbial and chemical analysis of Chihuahua cheese and relationship to histamine. *J Food Sci* **57**: 355-365.

Dicks LMT, Endo A (2009). Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. *S Afr J Enol Vitic* **30**: 72-90.

Du Tiot M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S (2011). *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview. *Food Bioprocess Technol* **4**: 876-906.

El-Sayed MM (1997). Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *Int J Dairy Sci* **6**: 1079-1086.

Etievant P (1991) Wine. In: Maarse H (ed). Volatile compounds in food and beverages. Marcel Dekker, Inc, New York.

Ferreira L, Vega S, Sanchez-Juanes F, Gonzalez M, Herrero A, Muniz MC, José González-Buitrago M, Muñoz JL (2010). Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption. *Enferm Infec Micr Cl* **8**: 492-497.

Fras P, Campos FM, Hogg T, Couto JA (2014). Production of volatile phenols by *Lactobacillus plantarum* in wine conditions. *Biotechnol Lett* **36**: 281-285.

G-Alegria E, López I, Ruiz J, Saenz J, Fernandez E, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, Ruiz Larrea F (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol Lett* **230**: 53-61.

Gambutì A, Strollo D, Erbaggio A, Lecce L, Moio L (2007). Effect of Winemaking Practices on Color Indexes and Selected Bioactive Phenolics of Aglianico Wine. *J Food Sci* **72**: 623–628.

García-Ruiz A, Requena T, peláez C, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV, Martínez-Cuesta MC (2013). Antimicrobial activity of lacticin 3147 against oenological lactic

acid bacteria. Combined effect with other antimicrobial agents. *Food Contr* **32**: 477-483.

García-Ruiz A, Bartolomé B, Martínez-Rodríguez A, Pueyo E, Martín Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV(2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Contr*, **19**: 835-841.

Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J (2003). Molecular characterization of tet(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1270-1275.

Gevers D, Huys G, Swings J (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 31-36.

Granchi, LG, Talini D, Rigacci S, Guerrini S, Berti A, Vicenzini M. (2006). Detection of putrescine-producer *Oenococcus oeni* strains by PCR. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, The Netherlands.

Grimaldi A, Bartowsky E, Jiranek V (2005a). Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J Appl Microbiol* **99**: 1061–1069.

Günata YZ, Blondeel C, Vallier MJ, Lepoutre JP, Sapis JC, Watanabe N (1998). An endoglycosidase from grape berry skin of Cv. M. Alexandria hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J Agric Food Chem* **46**: 2748–2753.

Günata YZ, Bayonove CL, Baumes RL, Cordonnier RE (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J Chromatogr A* **331**:83–90.

Hálás A, Baràth A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel WH (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol* **5**: 42-49.

Hernandez-Orte P, Cersosimo M, Loscos N, Cacho J, Garcia-Moruno E, Ferreira V (2009). Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Res Int* **42**: 773-781.

Huey B, Hall J (1989). Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. *J Bacteriol* **171**: 2582-2532.

Jackson R (2008). Wine Science. Academic Press, USA.

Johnston MD, Hanlon GW, Denyer SP, Lambert RJW (2003). Membrane damage to bacteria caused by single and combined biocides. *J Appl Microbiol* **94**: 1015 - 1023.

- Joosten HMLG (1988a). The biogenic amine contents of Ducht cheese and their toxicological significance. *Neth Milk Dairy J* **42**: 25-42.
- Joosten HMLG (1988b). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese 3. Factors influencing the amounts formed. *Neth Milk Dairy J* **41**: 329-357.
- Kandler O, Weiss N (1986). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds), Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209 – 1234.
- Karmas E (1981). Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Lebensm Wiss Technol* **14**: 273-275.
- Klijn N, Weerkamp AH, de Vos WM (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16s rRNA and specific DNA probes. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3390-3393.
- Kuensch U, Schaerer H, Temperli A (1989). Study of the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation. Poster presented at the International Conference on Biotechnology and Food, Feb. 20-24, Holienheim University, Stuttgart.
- Izquierdo P, García E, Martínez J, Chacón J (2004). Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel. *Vitis* **43**: 149-153.
- Izquierdo P, García E, Chacón JL, Martinez J (2003). Influencia de la cepa de bacteria láctica sobre la composición cromática de los vinos sometidos a fermentación maloláctica. *Alimentaria* **347**: 125-131.
- Lanvaud-Funel A (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *A Van Leeuw J Microb* **76**: 317-331.
- Llaubères RM, Richard B, Lanvaud-Funel A, Dubourdieu D (1990). Structure of an exocellular β -D-glucan from *Pediococcus* sp, a wine lactic acid bacterium. *Carbohydr Res* **203**: 103-107.
- López I, López R, Santamaria P, Torres C, Ruiz-Larrea F (2008). Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. *Vitis* **2**: 123-129.
- Loscos N, Hernandez-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chem* **120**: 205-216.
- Loscos N, Hernandez-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2009b). Fate of grape flavour precursors during storage on yeast less. *J Agr Food Chem* **57**: 5468-5479.

- Lucas P M, Blancato V S, Claisse O, Magni C, Lolkema J S, Lonvaud-Funel A (2007). Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiol* **153**: 2221–2230.
- Lupski J, Weinstock GM (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* **174**: 4525-4529.
- Maxa E., Brandes W. (1993). Biogene Amine in Fruchtsäften. *Mitt Klosterneuburg* **43**: 101-106.
- Maicas S, Mateo JJ (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices. *Appl Microbiol Biot* **67**: 322–335.
- Maijala R, Eerola S (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Sci* **35**: 387-395.
- Marcobal A, Polo MC, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV (2005). Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wine. *Food Research International* **38**: 387-394.
- Marcobal A, De las Rivas B, Moreno-Arribas MV, Munoz R (2004). Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiol Lett* **239**: 213-220.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl H-G (2009). *J Clin Microbiol* **47**: 2912-2917.
- Maria Saguir F, Loto Campos IE, Maturano C, Manca de Nadra MC (2009). Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavour development in wine. *Int J Wine Res* **1**: 175-185.
- Marine-Font A (1978). Alimentos y medicamentos: Interacciones (3° parte). *Circ F Arm* **258**: 43-45.
- Mateo JJ, Jiménez M (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *J Chromatogr A* **881**: 557–567.
- Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Iain S, Marotta F, Singh V, Parkash O, Yadav H (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J Dig Dis* **9**: 190–198.
- Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem* **95**: 405-412.

Moreno-Arribas MV, Polo MC, Jorganes F, Munoz R (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int J Food Microbiol* **84**: 117-123.

Muñoz-González C, Rodríguez-Becomo JJ, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Pozo-Bayón MA (2013). Recovery of aromatic aglycones from grape pomace winemaking by-products by using liquid-liquid and pressurized-liquid extraction. *Food Anal Method*.

Nielsen J.C, Prah C, Lonvaud-Funel A (1996). Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. *Am J Enol Vitic* **47**: 42-48.

Nout MJR (1994). Fermented foods and food safety. *Food Int Res* **27**: 291-298.

Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogués MT, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou M C (2003). Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *Food Chem Toxicol* **68**: 750-755.

Papalexandratou Z, Cleenwerck I, De Vos P, De Vuyst L (2009). (GTG)5-PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **301**: 44-49.

Papadopoulou C, Soulti K, Roussis IG (2005). Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Tech Biotech* **43**: 41-46.

Prah C, Lonvaud-Funel A, Korsgaard S, Morrison E, Joyeux A (1988). Etude d'un nouveau procede de declenchement de la fermentation malolactique. *Conn Vigne Vin* **22**: 197.

Perrot L, Charpentier M, Charpentier C, Feuillat, Chassagne D (2002). Yeast adapted to wine: nitrogen compounds released during induced autolysis in a model wine. *J Ind Microbiol Biot* **29**: 134-139.

Prah C, Korsgaard S, Morrison E (1989). The decarboxylation of L-malic acid in must by direct inoculation with homofermentative lactobacilli. *Proc IV Symp Int D'oenologie Bordeaux*. P. 314.

Querol A, Barrio E, Ramon D (1992). A comparative study of different methods yeast strains characterization. *Syst Appl Microbiol* **15**: 439-446.

Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni P, Cattaneo G, Comi G, Cocolin L (2005). Culture dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of italian fermented sausage. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1977-1986.

Reale A, Di Renzo T, Succi MA, Tremonte P, Coppola R, Sorrentino E (2011). Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. *World J Microb Biot* **27**: 237-244.

Regolamento (CE) N. 761/1999 della commissione del 12 aprile 1999 recante modifica del regolamento (CEE) n. 2676/90 che determina i metodi di analisi da utilizzare nel settore del vino.

Reguant C, Bordons A (2003). Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* **95**: 344–353.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud-Funel A (2007). Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinification, John Wiley & Sons Ltd.

Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006). Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments Vol 2: 205-227.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A (2003). Trattato di enologia II. Ed agricola, Bologna.

Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Micr* **55**: 197–207.

Rodas A, Ferrer S, Pardo I (2003). 16-S ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol* **26**: 412-422.

Rodriguez-Jerez JJ, Giaccone V, Colavita G, Parisi E (1994). Bacillus macerans-a new potent histamine producing microorganism isolated from Italian cheese. *Food Microbiol* **11**: 409-415.

Rodríguez-Becomo JJ, Selli S, Muñoz-González C, Martín-Álvarez PJ, Pozo-Bayón MA (2012). Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wines. *Food Res Int* **51**: 450-457.

Rodríguez-Bencomo JJ, Munoz-Gonzales C, Andujar-Ortiz I, Martin-Alvarez P, Moreno-Arribas MV, Pozo-Bayon MA (2011). Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *J Sci Food Agr* **91**: 2484-2494.

Rojo-Benzares B, Sanz Y, Zarazaga M, Torres C, Ruiz-Larrea F (2007). Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int J Food Microbiol* (in press).

Rosi I, Nannelli F (2005). I batteri malolattici selezionati e loro impiego. In: Microbiologia del vino (eds. Vincenzini M, Romano P, Farris GA), Casa Editrice Ambrosiana, Milano pag 289-299.

Salih AG, Le Quéré JM, Drilleau JF (2000). Effect of hydrocinnamic acids on the growth of lactic bacteria. (Action des acides hydroxycinnamiques libres et estérifiés sur la croissance des bactéries lactiques). *Sci Alim* **20**: 537-560.

- Schleifer K (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* **32**: 533-542.
- Saguir MF, Campos IEL, Maturano C, De Nadra MCM (2009). Identification of dominant lactic acid bacteria isolated from grape juices. Assessment of its biochemical activities relevant to flavor development in wine. *Int J Wine Res* **I**: 175-185.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.
- Sánchez-Patán F, Tabasco R, Monagas M, Requena T, Peláez C, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B (2012). Capability of *Lactobacillus plantarum* IFPL935 to catabolize flavan-3-ol compounds and complex phenolic extracts. *J Agr Fod Chem* **60**: 7142-7151.
- Serpa-Pimentel M, Silva MH, Cortes I, Mendes Faia A (1994). Growth and metabolism of sugar and acids of *Leuconostoc oenos* under different conditions of temperature and pH. *J Appl Bacteriol* **76**: 42-48.
- Shalaby AR (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int* **29**: 675-690.
- Sico MA, Bonomo MG, Salzano G (2008). Isolation and characterization of *Oenococcus oeni* from Aglianico wines. *World J Microb Biot* **24**: 1829-1835.
- Silla Santos MH (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* **29**: 213-231.
- Smith TA (1980). Amines in food. *Food Chem* **6**: 169-200.
- Solieri L, Genova F, De paola M, Giudici P (2009). Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *J Appl Microbiol* **108**: 285-298.
- Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S (2007). In Vivo PCR-DGGE Analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* Populations in Red Wine. *Curr Microbiol* **54** : 9-13.
- Spano G, Beneduce L, De palma L, Quinto M, Vernile A, Massa S (2006). Characterization of wine *Lactobacillus plantarum* by PCR-DGGE and RAPD-PCR analysis and identification of *Lactobacillus plantarum* strains able to degrade arginine. *World J Microb biot* **22**: 769-773.
- Spano G, Rinaldi A, Ugliano M, Moio L, Beneduce L, Massa S (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J Appl Microbiol* **98**: 855-861.
- Spano G, Chieppa G, Beneduce L, Massa S (2004). Expression of a putative arcA, arcB, arcC genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *J Appl Microbiol* **96**: 185-193.

Stratiotis AL and Dicks LMT (2001). Identification of *Lactobacillus* spp. Isolated from different phases during the production of a South African fortified wine. *S Afr J Enol Vitic* **23**: 14-21.

Suzzi G, Arfelli G, Schirone M, Corsetti A, Perpetuini G, Tofalo R (2012). Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality. *Food Res Int* **46**: 22–29.

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius LS (2005). Yeast and bacteria modulation of wine aroma and flavour. *Aus J Grape Wine Res* **11**: 139-173.

Tabasco R, Sánchez-Patán F, Monagas M, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV, Peláez C, Requena T (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol* **28**: 1345-1352.

Taylor SL, Hui JY, Lyous DE (1984). Toxicology of scombroid poisoning. In *Seafood Toxins*. ed. E. P. Ragils, ACS Symp. Ser. 262. Washington, DC, p. 417.

Theobald S, Pfeiffer P, Zuber U, König H (2008). Influence of epigallocatechin gallate and phenolic compounds from green tea on the growth of *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* **104**: 566-572.

Torriani S, Felis G, Dellaglio F (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3450-3454.

Tosi E, Veneri ., Cipriani M, Vagnoli P, Zapparoli G (2007). Valutazione d' idoneità qualitativa di un ceppo di *Oenococcus oeni* da impiegare come starter della fermentazione malolattica in vino. *Riv Vitic Enol* **1**: 35-47.

Tsuchiya Y, Kano Y, Koshino S (1994). Identification of lactic acid bacteria using temperature gradient gel electrophoresis for DNA fragments amplified by polymerase chain reaction. *J Amer Soc Brew Chem* **52**: 95-99.

Ugliano M, Moio L (2006). The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *J Sci Food Agr* **86**: 2468-2476.

Ugliano M, Genovese A, Moio L (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem* **51**: 5073-5078.

Vauterin L, Vauterin P (1992). Computer-aided objective comparison of electrophoretic patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur Microbiol* **1**: 37-41.

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* **5**: 25-40.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski (1991). Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic Acids Res* **19**: 6823-6831.

Versari A, Parpinello GP, Cattaneo M (1999). *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biotec* **23**: 447-455.

Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Martìn-Morro M, Mariné-Font A (1990). Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chem* **37**: 239-349.

Vincenzini M, Romano P, Farris GA (2005). *Microbiologia del vino*. Edizioni Ambrosiana.

Williams G, Kubelik A, Livak K, Rafalski A, Tingey S (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535.

Zambonelli (2003). *Microbiologia e Tecnologia dei vini*.

Zapparoli G, Spinelli P, Torriani S, Dellaglio F (2003). The spontaneous malolactic fermentation in wines of the Valtellina area: A study of the kinetic parameters and of the dominant *Oenococcus oeni* strains. *Vitic. Enol* **2**: 47-56.

Zhang ZY, Liu C, Zhu YZ, Zhu YQ, Zheng HJ, Zhao GP, Wang SY, Guo XK (2009). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. *J Bacteriol* **191**: 5020-5021.