

INDICE

1 INTRODUZIONE: I BATTERI LATTICI IN AMBITO ENOLOGICO	3
1.1 DEFINIZIONE E GENERALITÀ DEI BATTERI LATTICI	5
1.2 METABOLISMO DEI BATTERI LATTICI	8
1.2.1 Metabolismo degli zuccheri	8
1.2.1.1 <i>Metabolismo omofermentante degli esosi</i>	8
1.2.2 Fermentazione malolattica	11
1.3 I BATTERI LATTICI PIÙ FREQUENTI IN AMBITO ENOLOGICO	15
1.3.1 Genere <i>Lactobacillus</i>	15
1.3.2 Genere <i>Oenococcus</i>	16
1.3.3 Genere <i>Pediococcus</i>	18
1.3.4 Genere <i>Leuconostoc</i>	18
1.4 I BATTERI LATTICI DELL'UVA	19
1.5 I BATTERI LATTICI NEL VINO	20
1.5.1 Sviluppo della componente batterica durante la vinificazione	20
1.5.2 Contaminazioni batteriche e “le malattie del vino”	22
1.6 I BATTERI LATTICI E LA VINACCIA	27
1.6.1 La vinaccia: definizione e classificazione	27
1.6.2 Composizione chimica della vinaccia	28
1.6.3 Il distillato di vinaccia: la grappa	31
1.6.4 Il ciclo produttivo della grappa	32
1.6.5 Insilamento della vinaccia	33
1.6.6 La microflora della vinaccia	37
1.6.6.1 <i>I lieviti</i>	37
1.6.6.2 <i>I batteri acetici</i>	38
1.6.6.3 <i>I batteri lattici: il loro possibile ruolo in vinaccia</i>	39
1.7 SCOPI DELLA TESI	40
2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI BATTERI DA VINACCIA SOTTOPOSTA A DIVERSI TRATTAMENTI TECNOLOGICI	43
2.1 INTRODUZIONE	43
2.1.1 Caratterizzazione di batteri enologici	44
2.1.1.1 <i>Tecniche fenotipiche di caratterizzazione</i>	44
2.1.1.2 <i>Tecniche genotipiche</i>	47
2.2 MATERIALI E METODI	55
2.2.1 Ceppi batterici	55
2.2.2 Ceppo utilizzati per l'inoculo della vinaccia	55
2.2.3 Mezzi colturali	56
2.2.4 Campionamento di vinacce	58
2.2.5 Isolamento dei batteri da vinaccia	58
2.2.6 Caratterizzazione molecolare mediante 16S-ARDRA	59
2.2.6.1 <i>Lisi cellulare</i>	59
2.2.6.2 <i>Amplificazione del DNA</i>	59
2.2.6.3 <i>Elettroforesi dei prodotti di PCR</i>	60
2.2.6.4 <i>Restrizione del DNA</i>	60
2.2.6.5 <i>Elettroforesi dei prodotti della digestione enzimatica</i>	60
2.2.6.6 <i>Sequenziamento del DNA</i>	60
2.2.7 Caratterizzazione molecolare mediante rep-PCR	61
2.2.7.1 <i>Estrazione del DNA</i>	61
2.2.7.2 <i>Elettroforesi e quantificazione del DNA estratto</i>	61
2.2.7.3 <i>Amplificazione del DNA</i>	62
2.2.7.4 <i>Elettroforesi dei frammenti di amplificazione</i>	62
2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE	63
2.3.1 Allestimento della prova sperimentale	63
2.3.2 Analisi quantitativa della popolazione batterica	66
2.3.3 Scelta del sistema di analisi per la caratterizzazione a livello di specie	71
2.3.4 Caratterizzazione a livello di specie degli isolati raccolti da	

vinaccia non trattata.....	74
2.3.5 Scelta del sistema di analisi per la caratterizzazione a livello di ceppo degli isolati	84
2.3.6 Caratterizzazione molecolare a livello di ceppo degli isolati di <i>L.plantarum</i>	
provenienti da vinaccia non trattata.....	86
2.3.7 Caratterizzazione molecolare degli isolati di <i>Lactobacillus plantarum</i> provenienti da	
altre matrici vegetali.....	91
2.3.8 Caratterizzazione molecolare a livello di ceppo degli isolati di <i>O.oeni</i> provenienti	
da vinaccia acidificata.....	95
3 CARATTERIZZAZIONE FISIOLÓGICA DEGLI ISOLATI APPARTENENTI ALLA	
SPECIE DOMINANTE NELLA VINACCIA NATURALE.....	99
3.1 INTRODUZIONE.....	101
3.1.1 La specie <i>L.plantarum</i>	101
3.1.2 <i>L.plantarum</i> in enologia.....	102
3.1.3 Le batteriocine.....	104
3.1.3.1 <i>Batteriocine in L.plantarum</i>	106
3.1.4 Il biofilm.....	108
3.1.4.1 <i>Biofilm in L.plantarum</i>	111
3.1.4.2 <i>Biofilm nei lieviti</i>	112
3.2 MATERIALI E METODI.....	115
3.2.1 Curva di crescita.....	115
3.2.2 Saggio dell'attività antimicrobica.....	115
3.2.3 Biofilm assay.....	116
3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	118
3.3.1 Andamento della curva di crescita.....	119
3.3.2 Determinazione dell'attività antimicrobica.....	121
3.3.3 Formazione di biofilm da parte di isolati di <i>L.plantarum</i>	126
3.3.4 Formazione di biofilm da parte di isolati di <i>S.cerevisiae</i>	132
3.3.5 Formazione di biofilm in colture contenenti combinazioni di ceppi di <i>L.plantarum</i> e	
ceppi di <i>S.cerevisiae</i>	133
4 CONCLUSIONI.....	141
5 BIBLIOGRAFIA.....	151

1 INTRODUZIONE

I BATTERI LATTICI IN AMBITO ENOLOGICO

Il lavoro di ricerca bibliografica e sperimentale riportato in questa tesi ha avuto come soggetto lo studio dei batteri lattici in ambito enologico e in particolare è stato indagato il ruolo che questi microrganismi assumono quali colonizzatori della vinaccia, destinata alla produzione di grappa, durante le diverse fasi della sua lavorazione.

I batteri lattici, per le loro caratteristiche di organismi ubiquitari e di rilevanza in ambito tecnologico e sanitario, sono spesso al centro del dibattito scientifico internazionale, ma anche socio-culturale, basti pensare al loro ruolo nella produzione di conservanti naturali, oppure come probiotici o ancora come agenti contaminanti dei cibi fermentati con produzione di amine biogene.

Al contrario, nel settore enologico, i batteri lattici per molto tempo non hanno destato l'interesse degli studiosi in quanto sino alla fine del XIX secolo, i lieviti sono stati considerati gli unici responsabili, con la fermentazione alcolica, della formazione di tutte le sostanze capaci di caratterizzare organoletticamente vini e distillati. Ai batteri lattici al contrario venivano e vengono tuttora attribuite una valenza principalmente negativa

Solo cinquant'anni dopo gli "Etudes sur le vin" di Pasteur del 1866, si riconobbe a questi batteri nel settore enologico una valenza positiva in quanto agenti della disacidificazione biologica del vino mediante la trasformazione dell'acido L-malico in acido L-lattico, processo oggi ampiamente studiato, noto come fermentazione malolattica (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.1 DEFINIZIONE E GENERALITÀ DEI BATTERI LATTICI

Batteri lattici sono definiti quei microrganismi che dalla fermentazione degli zuccheri producono prevalentemente acido lattico. Questi batteri sono essenzialmente ubiquitari e normalmente presenti nei prodotti alimentari, intervengono in numerosi processi fermentativi naturali e trovano largo uso anche a livello industriale. In particolare sono utilizzati per la produzione industriale di acido lattico, sono gli agenti della maturazione dei formaggi e dei foraggi insilati, sono insieme ai lieviti i costituenti della lievitazione dei prodotti da forno.

In alcuni casi i batteri lattici possono essere responsabili di processi degradativi o patologie nell'uomo. Alcuni di loro sono batteri intestinali e possono anche essere assunti dall'uomo come probiotici (Makarova e Konin, 2007).

In ambito enologico sono gli agenti della fermentazione malolattica e sono anche causa di alcuni difetti del vino conosciuti con il termine “girato” o “filante” (Vincenzini *et al.*, 2005).

Questi microrganismi possono avere forma a cocco o a bastoncello, sono Gram positivi, catalasi negativi (con l’eccezione di alcune specie del genere *Pediococcus*), hanno cellule non mobili e non formano spore, sono anaerobi o microaerofili, cioè si moltiplicano bene in assenza totale o parziale di ossigeno, anche se molto di essi lo tollerano senza utilizzarlo nei processi di produzione di energia.

I batteri lattici enologici non sono in grado di utilizzare l’azoto inorganico e non possiedono attività proteolitica quindi non possono utilizzare le proteine, per questi motivi nel mezzo di coltura essi devono trovare miscele di aminoacidi o peptidi. Richiedono inoltre la presenza di molte vitamine come la biotina, la riboflavina e la tiamina in varie combinazioni e in modo diverso a seconda della specie.

Tra i batteri lattici troviamo specie termofile e mesofile, le prime non hanno interesse enologico in quanto non sono in grado di crescere nel vino. Il pH ottimale varia da 7 e 5 ma le specie di interesse enologico sono quelle che riescono a crescere ai pH bassi del vino che può raggiungere anche il valore di 3 unità.

La definizione di batteri lattici si basa sostanzialmente sulla loro biologia più che sulla tassonomia, si tratta infatti di una classificazione funzionale. Questo taxa che appartiene al phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordine *Lactobacillales*, include una varietà di generi tra cui alcuni di particolare rilevanza a livello industriale come *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (Makarova *et al.*, 2006). Il grande interesse industriale verso questi microrganismi ha spinto notevolmente la ricerca in questo campo negli ultimi anni e infatti sono già 18 i genomi di batteri lattici sequenziati (che coprono 14 specie diverse) di cui il primo è stato quello di *Lactobacillus plantarum* nel 2003 (Kleerebezem *et al.*, 2003).

Le numerose informazioni acquisite grazie alla conoscenza del genoma di questi microrganismi, hanno permesso di effettuare degli studi avanzati di filogenesi e genomica evolutiva. In particolare il recente sequenziamento dei genomi di molte specie dell’ordine *Lactobacillales* ha aperto un dibattito sulla tassonomia di questo gruppo di batteri lattici. In un recente studio è stata dimostrata con tecniche

di genomica e ibridazione DNA-DNA, l'origine polifiletica di alcune delle specie appartenenti all'ordine *Lactobacillales*, per le quali è stato proposto un percorso evolutivo che li organizza in 3 gruppi. Le relazioni filogenetiche così ricostruite individuano il gruppo *L. casei-Pediococcus*, un gruppo *L. delbrueckii* e un gruppo *Leuconostoc*, mentre il gruppo *Streptococcus-Lactococcus* risulta completamente separato dagli altri (figura 1.1). I primi due gruppi sarebbero gruppi fratelli che si sono separati nell'evoluzione successivamente alla biforcazione che ha originato il gruppo *Streptococcus-Lactococcus* (Makarova *et al.*, 2006).

Queste relazioni filogenetiche sono state confermate da altri studi condotti recentemente, studi che hanno anche rivelato la elevata eterogeneità dei tassi di evoluzione tra i diversi componenti del gruppo batteri lattici. Infatti alcune specie evolvono molto più velocemente di altri in seguito ad eventi di delezione e trasferimento orizzontale di geni. Ad esempio il genere *Oenococcus*, evolve in modo più veloce degli altri e questo potrebbe spiegare la sua capacità di adattamento così specifica all'ambiente enologico (Makarova e Koonin, 2007).

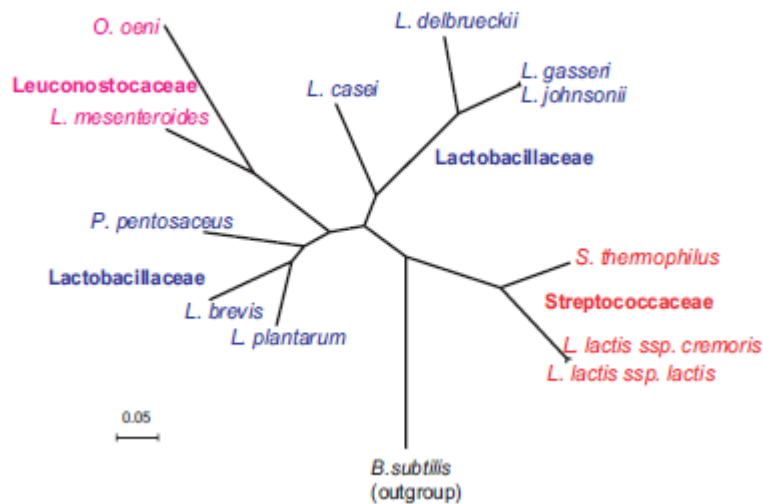


FIG. 1.1 Albero filogenetico dell'ordine *Lactobacillales* basato sull'allineamento di proteine ribosomiali. Le famiglie e le relative specie, sono distinte secondo l'attuale classificazione in: *Lactobacillaceae*, blu; *Leuconostocaceae*, magenta; *Streptococcaceae*, rosso. Tratto da Makarova *et al.*, 2006

1.2 METABOLISMO DEI BATTERI LATTICI

I batteri lattici hanno un metabolismo esclusivamente fermentativo anche in presenza di ossigeno. L'assenza della catalasi provoca l'impossibilità di degradare le forme tossiche dell'ossigeno come il perossido d'idrogeno che si forma durante il metabolismo ossidativo (respirazione), per questo molti batteri lattici sono anaerobi, ma alcune specie riescono comunque a inattivare il perossido e pertanto possono essere definiti aerotolleranti o microaerofili.

Dal punto di vista nutrizionale i batteri lattici hanno esigenze complesse: necessitano di una fonte di carbonio generalmente glucosio, richiedono vitamine, elementi minerali come manganese e magnesio utilizzati come cofattori del metabolismo, e una fonte di azoto.

1.2.1 Metabolismo degli zuccheri

I batteri lattici possono metabolizzare gli zuccheri esosi come glucosio o i pentosi come ribosio, arabinosio, xilosio, ramnosio. Il metabolismo degli esosi segue due vie enzimatiche, la via omofermentativa e quella eterofermentativa a seconda della specie batterica, che portano a differenti prodotti finali e hanno una diversa resa energetica. Il metabolismo dei pentosi segue in tutti i batteri lattici un'unica via metabolica detta dei pentosi fosfati.

1.2.1.1 Metabolismo omofermentante degli esosi

I batteri omofermentanti degradano il glucosio attraverso la via glicolitica con formazione del piruvato che viene poi ridotto ad acido lattico per opera della lattato deidrogenasi, con la contemporanea ri-ossidazione del coenzima NADH. Con questa via metabolica per ogni mole di glucosio si producono 2 moli di acido lattico e si ottiene una resa energetica di 2 moli di ATP (Vincenzini *et al.*, 2005).

In figura 1.2 è illustrata la via omofermentante di degradazione del glucosio

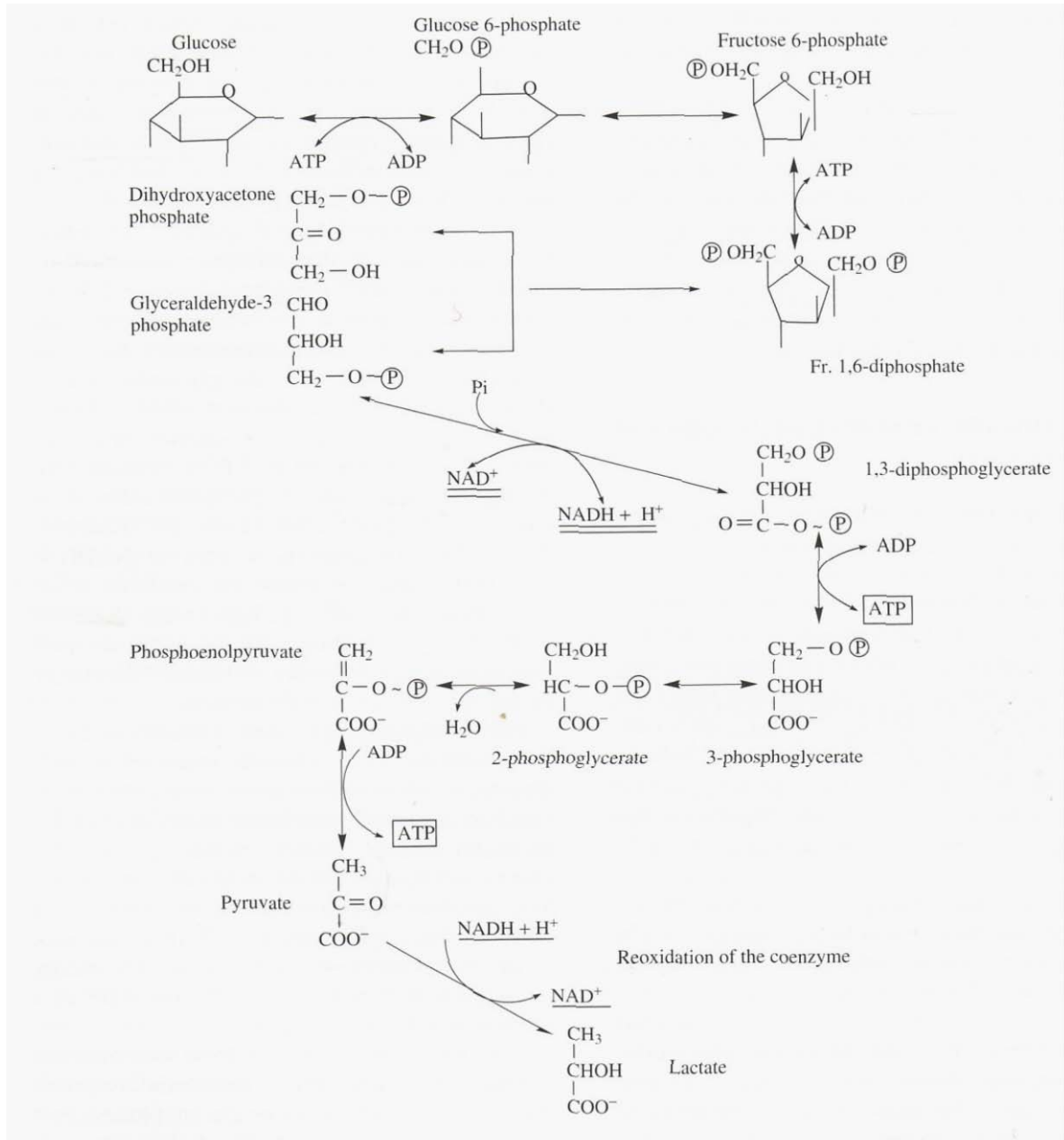


FIG. 1.2 Degradazione del glucosio in batteri omofermentanti

1.2.1.2 Metabolismo eterofermentativo degli esosi

Nei batteri eterofermentanti la via fermentativa degli esosi non segue la glicolisi ma la via dei pentosi fosfati poiché mancano dell'enzima aldolasi (enzima della glicolisi che catalizza la scissione del fruttosio difosfato nei due trioso fosfati).

Nella via dei pentosi fosfati la reazione chiave è la scissione dello xilulosio in gliceraldeide 3-fosfato e acetil fosfato, catalizzata dall'enzima fosfochetolasi.

La gliceraldeide 3-fosfato viene poi metabolizzata a acido lattico seguendo la via omofermentativa; l'acetil-fosfato invece viene normalmente ridotto ad etanolo con contemporanea ri-ossidazione del coenzima NADH (vedi figura 1.3).

In condizioni aerobiche invece può essere convertito ad acetato mentre il coenzima NADH viene riossidato tramite la riduzione del fruttosio a mannitolo.

I batteri eterofermentanti da una mole di glucosio formano una miscela equimolare di acido lattico, anidride carbonica e etanolo con una resa energetica in ATP di una sola mole (Vincenzini *et al.*, 2005).

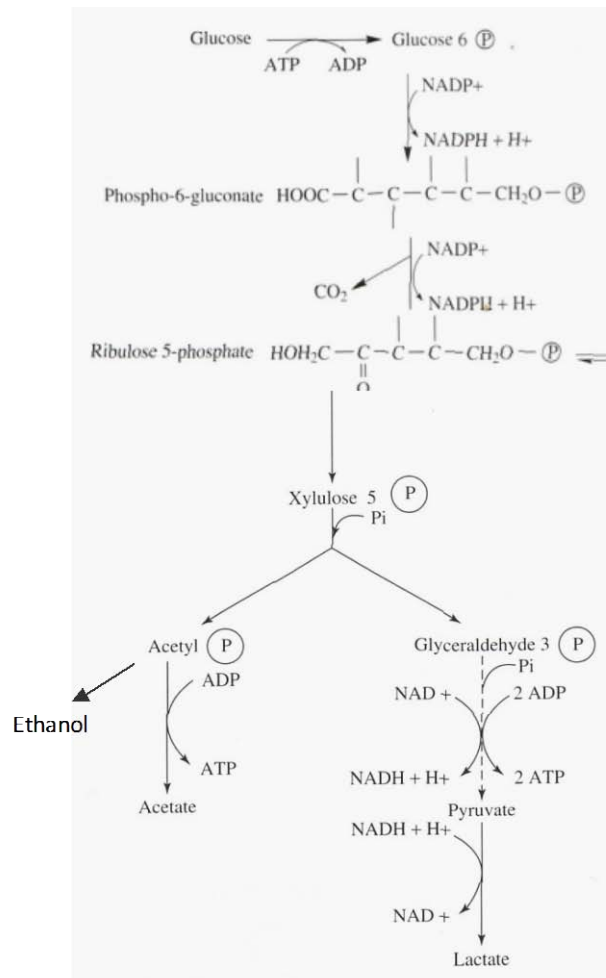


FIG. 1.3 Degradazione del glucosio in batteri eterofermentanti

1.2.1.3 Metabolismo dei pentosi

Sia i batteri omofermentanti che quelli eterofermentanti metabolizzano i pentosi attraverso la via dei pentosi fosfati, con produzione di acetilfosfato che viene sempre trasformato in una molecola di acetato. La resa energetica è di 2 ATP e quindi maggiore rispetto alla resa della degradazione del glucosio. In figura 1.4 è illustrata la via dei pentosi fosfati.

Per quanto riguarda la capacità di metabolizzare i diversi tipi di pentosi, vi sono delle differenze tra le specie di batteri lattici. Ad esempio nel genere *Lactobacillus* il fruttosio e il ribosio è sempre fermentato mentre lo xilosio è fermentato unicamente da *L. hilgardii*. Nel genere *Pediococcus* generalmente il fruttosio viene fermentato, ribosio e arabinosio vengono fermentati da *P. pentosaceus*. *O. oeni* invece può fermentare oltre al fruttosio anche il trealosio, la capacità di utilizzare arabinosio, xilosio e ribosio varia da ceppo a ceppo (Vincenzini *et al.*, 2005).

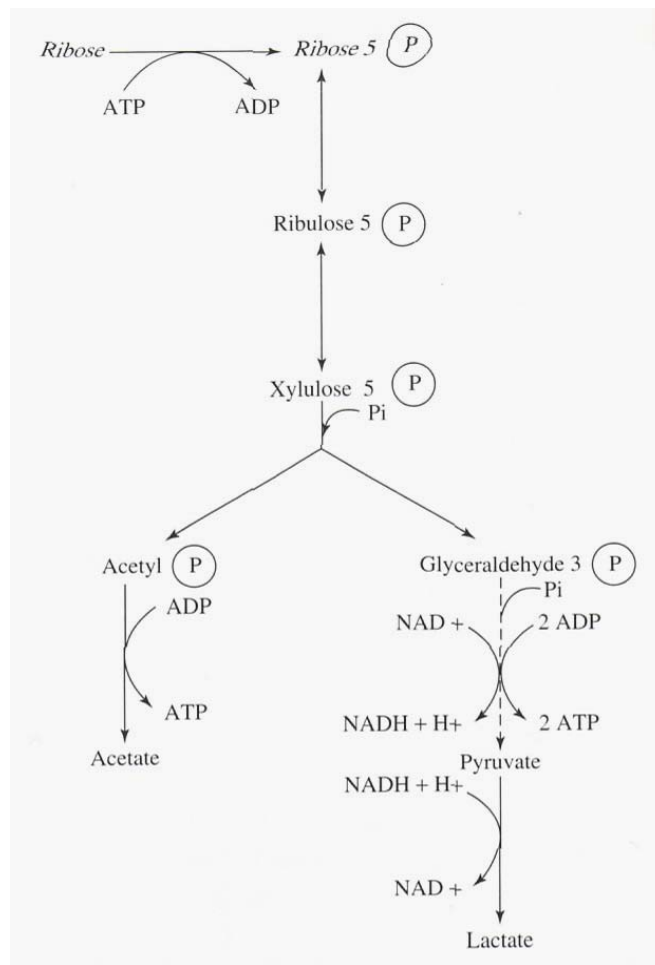


FIG. 1.4 Degradazione degli zuccheri pentosi nei batteri lattici

1.2.2 Fermentazione malolattica

1.2.2.1 Meccanismo di reazione

La fermentazione malolattica è la reazione di trasformazione dell'acido L-malico presente nel vino in acido L-lattico e anidride carbonica (figura 1.5). Questo processo avviene in vino ad opera di batteri definiti appunto da una parte del modo scientifico "malolattici" tra cui i più importanti appartengono alla specie *O. oeni*, ma anche al genere *Lactobacillus*. Si tratta di una decarbossilazione dell'acido L-malico, un acido bicarbossilico, con formazione un acido monocarbossilico, l'acido L-lattico, conversione catalizzata dall'enzima malolattico, un enzima NADP dipendente che necessita di cationi bivalenti come ioni manganese o magnesio. (Vincenzini *et al.*, 2005).

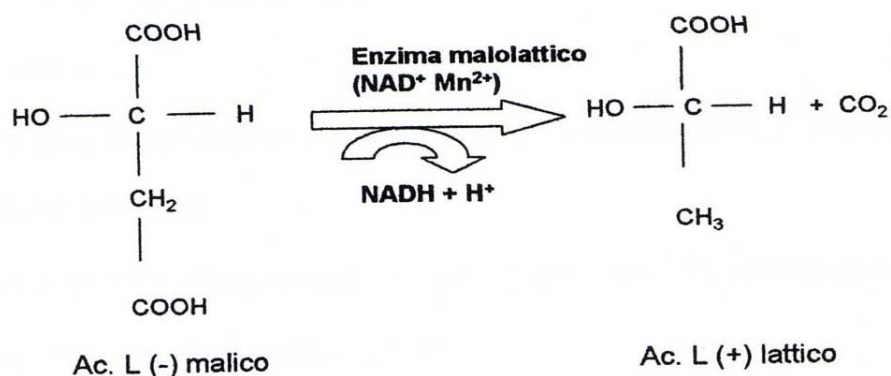


FIG. 1.5 La fermentazione malolattica

Questa reazione è ben diversa da quella catalizzata dall'enzima malico, che consiste nella degradazione dell'acido malico a piruvato. Si tratta, quest'ultima, di una decarbossilazione ossidativa alla quale segue la riduzione del piruvato a L-lattato catalizzata dall'enzima lattato deidrogenasi. Nei batteri lattici enologici la fermentazione malolattica avviene solo tramite la reazione catalizzata dall'enzima malolattico, che attualmente si ritiene avvenga in due passaggi: nel primo il malato viene convertito in piruvato attraverso una decarbossilazione ossidativa. Nel secondo passaggio il piruvato, che resta legato all'enzima, viene ridotto a lattato. Entrambe le attività enzimatiche si trovano sulla stessa proteina e

sembrano agire simultaneamente per cui la reazione in realtà è una conversione diretta senza produzione di composti intermedi (Matthews *et al.*, 2004).

Il vantaggio energetico della reazione non consiste in una produzione diretta di ATP dalla decarbossilazione dell'acido L-malico, ma consiste nella formazione di una forza proton-motrice che permette la sintesi di ATP a livello delle ATP sintasi localizzate sulla membrana. Infatti l'entrata dell'acido L-malico nella cellula avviene attraverso un sistema di uniporto sottoforma di ione carico negativamente, e questo genera una differenza di potenziale elettrico con carica negativa all'interno della cellula. Mentre dopo la reazione di decarbossilazione l'acido L-lattico formato fuoriesce dalla cellula per diffusione passiva, che equivale a una traslocazione di uno ione idrogeno verso l'esterno, quindi di crea un gradiente di pH con valori alcalini all'interno della cellula. La differenza di potenziale e il gradiente protonico formano la forza proton motrice che viene sfruttata dalla ATP sintasi di membrana per sintetizzare ATP. La fermentazione malolattica fornisce energia alla cellula a bassi valori di pH (3-3,5) tipici del vino, perché in queste condizioni l'acido L-malico è presente nella forma ionica, mentre a pH più alti la reazione viene inibita (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.2.2.2 Enzima malolattico

L'enzima malolattico detto anche MLE, è stato per la prima volta purificato in *L. plantarum* e successivamente in molti altri batteri lattici enologici. L'enzima è stato studiato approfonditamente per la notevole importanza che riveste la reazione da esso catalizzata durante la vinificazione. La proteina è un oligomero costituito da 2 o 4 subunità di 70kDa e contiene siti di legame del NAD e del malato, oltre al sito di legame relativo all'intermedio di reazione. La sua cinetica è stata studiata in diversi batteri e sembra avere un *optimum* di pH tra 4,5 e 4,9. Il meccanismo di reazione sembra prevedere dapprima il legame dei cofattori NAD e Mn^{2+} in appositi siti dell'enzima, e l'unione con il malato. Inibitori di questo enzima sono gli acidi carbossilici del vino come l'acido tartarico, citrico e lattico oltre ai polifenoli (Lonvaud-Funel e De Saad, 1982).

Studi molecolari hanno rivelato che la proteina MLE è codificata dall'enzima *mleS*, un gene molto simile a quello codificante l'enzima malico. Il gene risulta molto conservato tra le specie di batteri lattici, a causa della fondamentale importanza di questa reazione per la cellula batterica. Il locus che contiene il gene

mleS contiene anche due geni che codificano per un trasportatore di malato (Groisillier e Lonvaud-Funel, 1999).

1.2.2.3 Effetti della fermentazione malolattica sulle caratteristiche organolettiche del vino.

Gli effetti della fermentazione malolattica sul vino sono principalmente la riduzione dell'acidità, l'aumento della stabilità microbiologica e il miglioramento delle proprietà organolettiche. Tradizionalmente le pratiche enologiche consigliano di favorire la fermentazione malolattica nei processi di vinificazione della maggior parte dei vini rossi e anche in alcuni bianchi soprattutto quelli con acidità elevata.

L'effetto organolettico conseguente alla degradazione dell'acido malico non è solo dovuta all'aumento del pH, ma anche alla sostituzione dell'anione malico di sapore aspro, con l'anione lattico che è decisamente più dolce, quindi il vino acquisisce un gusto più morbido e vellutato.

Le modificazioni del profilo organolettico e qualitativo del vino dovute alla fermentazione malolattica riguardano inoltre il colore e l'aroma. Possono avere carattere positivo o negativo a seconda dell'attività metabolica dei ceppi che conducono la fermentazione malolattica. Per quanto riguarda il colore, la disacidificazione comporta una diminuzione dell'intensità a causa del cambiamento del rapporto tra le forme colorate e non colorate degli antociani. L'astringenza diminuisce grazie alla reazione di legame tra tannini e antociani che riduce la quantità di antociani liberi. Le modifiche dell'aroma sono invece dovute alla riduzione del carattere erbaceo e all'aumento delle note fruttate dovute alla complessa attività batterica.

I fattori che influenzano l'andamento della fermentazione malolattica sono quei parametri fisico-chimici che controllano lo sviluppo della popolazione batterica nel vino (temperatura, pH, grado alcolico, presenza di anidride solforosa), popolazione che deve avere una concentrazione compresa tra 10^5 - 10^6 CFU/ml affinché venga avviata la degradazione dell'acido malico. Le condizioni favorevoli allo sviluppo batterico nel vino sono le seguenti: pH superiore a 3 (possibilmente attorno a 3,3), temperatura tra i 18 e i 20°C, concentrazione di etanolo non superiore al 12% e anidride solforosa possibilmente assente (Vincenzini *et al.*, 2005).

La cinetica di degradazione dell'acido malico ha andamenti diversi che si tratti di un fenomeno spontaneo condotto dai batteri indigeni originariamente presenti nel vino, o di un processo indotto dall'inoculo di starter malolattici appositamente selezionati. La fermentazione spontanea ha generalmente un decorso imprevedibile a causa delle condizioni proibitive del vino. Spesso infatti i parametri chimico-fisici visti in precedenza si scostano molto da quelli ottimali rendendo il vino un ambiente sfavorevole alla la crescita batterica. Infatti le basse temperature delle cantine, il basso pH del vino e il tenore alcolico, tendono a rallentare lo sviluppo della popolazione batterica, con conseguente allungamento dei tempi necessari alla fermentazione malolattica per degradare tutto l'acido malico.

La fermentazione indotta rappresenta quindi una risposta al problema della gestione di una fermentazione malolattica spontanea. I ceppi inoculati vengono sottoposti a specifici processi di selezione basati sulla capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in vino e anche su criteri che tengono in considerazione l'effetto della sviluppo batterico sulla variazione gusto e aroma del prodotto finito (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.3 I BATTERI LATTICI PIÙ FREQUENTI IN AMBITO ENOLOGICO

Il vino rappresenta un mezzo nutritivo che può permettere lo sviluppo dei batteri lattici grazie alla presenza di aminoacidi, vitamine (rilasciate dai lieviti a fine fermentazione alcolica) e composti fermentescibili come acido malico, acido citrico, zuccheri residui. I batteri lattici enologici in grado di svilupparsi nel vino con valore positivo in quanto governano la fermentazione malolattica, sono solo una parte di quelli presenti originariamente sulla superficie della bacca che si ritrovano poi nel mosto. Le condizioni di fermentazione selezionano i più idonei che rimarranno nel vino. In parte questi andranno a determinare la microflora della vinaccia, scartata durante la produzione, e la loro composizione sarà influenzata dal processo di vinificazione che prevede il momento esatto di separazione della vinaccia dal mosto (prima o a fine fermentazione alcolica). I generi comunemente presenti in ambito enologico sono i seguenti: *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003).

1.3.1 Genere *Lactobacillus*

Comprende batteri lattici di forma bastoncellare, con dimensioni che variano da 1-10 μm 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 di solo acido lattico. Di questo gruppo fanno parte le specie *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* e *L. mali* che rappresenta l'unica specie di interesse enologico del gruppo (Vincenzini *et al.*, 2005).

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 mosto 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 acido acetico. In questo gruppo troviamo le specie *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. collinoides*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans* (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.3.2 Genere *Oenococcus*

Questo genere è stato proposto nel 1995 con la riclassificazione della specie *Leuconostoc oenos* in *Oenococcus oeni* (Dicks *et al.* 1995) basata sulla analisi comparata delle sequenze del DNA ribosomale e sull'ibridazione DNA-DNA. La specie *O. oeni* ha una spiccata capacità di crescere in condizioni di elevata acidità e in presenza di alte concentrazioni di etanolo e necessita di un fattore di crescita presente nel succo di pomodoro. Queste caratteristiche fenotipiche sono distintive della specie e non essendo condivise dal resto del genere *Leuconostoc*, hanno confermato la necessità di costituire un nuovo genere (Dicks *et al.* 1995).

Morfologicamente si tratta di cellule di forma coccica, disposte in coppia o in catenelle, le dimensioni sono di circa 0,5 μm . Si tratta di microrganismi eterofermentanti e anaerobi facoltativi.

Di questo genere fanno parte attualmente solo le specie *O.oeni* e *O.kitharae*.

Fino a qualche anno fa si riteneva che *O.oeni* fosse l'unica specie appartenente a questo genere (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003). invece recentemente è stata scoperta un'altra specie attribuita al genere *Oenococcus*: la specie *O.kitharae*.

La specie *O.kitharae* isolato dalla produzione del distillato shochu a differenza di *O.oeni* non è acidofila e non è in grado di condurre la fermentazione malolattica (Endo e Okada, 2006).

La specie più importante di questo genere è *O.oeni* una specie di fondamentale rilevanza in enologia in quanto è il principale agente della fermentazione malolattica. Numerosi studi sono stati condotti su questa specie ai fini della caratterizzazione delle sue proprietà di resistenza a condizioni di stress presenti nel vino come pH basso e alte concentrazioni di etanolo, infatti per questa specie sono riportati un optimum di pH di 4,3-4,8 ed è universalmente accettato che cresca in un mezzo contenente 10% di etanolo (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003).

Diversi meccanismi rendono questa specie in grado di resistere all'ambiente vino, tra i quali la modifica della fluidità della membrana plasmatica, l'attivazione di ATPasi di membrana e la sintesi di proteine coinvolte nella risposta allo stress ambientale (Sico *et al.*, 2009).

Il genoma di un ceppo di *O.oeni* originariamente isolato da un vino americano durante la fermentazione malolattica è stato recentemente interamente sequenziato (Mills *et al.*, 2005).

Il ceppo PSU-1 ha un genoma di 1,8Mbp che codifica per circa 1700 proteine, molte delle quali corrispondono a trasportatori di aminoacidi e zuccheri e ai sistemi metabolici per l'utilizzo dei carboidrati e degli acidi organici. Questi studi genomici hanno anche portato alla scoperta di un alto livello di polimorfismo tra ceppi di *O.oeni*, dovuto ai numerosi processi di ricombinazione genetica e trasferimento orizzontale di geni che oltre a creare un grande biodiversità si pensa abbia avuto un ruolo fondamentale nell'adattamento della specie all'ambiente enologico. Interessante notare anche la presenza nel genoma di questa specie di sequenze di origine fagica e di regioni altamente variabili responsabili della plasticità del genoma (Bon *et al.*, 2009).

Nell'evoluzione della specie e in generale del genere *Oenococcus*, si è dimostrata fondamentale il ruolo della ipermutabilità del genoma, dovuto alla mancanza dei geni *mut* che codificano per proteine coinvolte nel sistema di riparazione dei danni del DNA dovuti all'erroneo appaiamento delle basi (detto *mismatch*), questo

comporta un'elevata incorporazione di mutazioni, molto maggiore rispetto a specie del genere correlato *Leuconostoc* (Marcobal *et al.*, 2008).

1.3.3 Genere *Pediococcus*

Questi microrganismi sono omofermentanti. Le cellule hanno forma di cocco con dimensioni di circa 1-2 μ m. La divisione cellulare avviene contemporaneamente su due piani perpendicolari generando dei caratteristici tetradi composti da 4 cellule (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003).

Si tratta di specie omofermentanti che hanno come optimum di temperatura 25°C e di pH tra 3,5 e 6,2. Sono microrganismi tipici dei vegetali e dei cibi fermentati e contaminanti della birra (Dobson *et al.*, 2002).

Di questo gruppo sono state riscontrate in vino le specie *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* (Vincenzini *et al.*, 2005).

Nel vino queste specie causano l'alterazione denominata filante, dovuta alla produzione di polisaccaridi extracellulari come i composti D-glucanici. La specie *P. parvulus* è tra i batteri responsabili dell'alterazione detta amarore del vino, dovuta alla produzione di acroleina dalla degradazione del glicerolo. In particolare *P. damnosus* è molto diffuso negli alimenti dove è responsabile di contaminazioni soprattutto nella birra e nel vino (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.3.4 Genere *Leuconostoc*

Si tratta di microrganismi eterofermentanti, con produzione di 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 riscontrate in vino è *Leuc. mesenteroides*, una specie che si trova in particolare nei mosti all'inizio del processo di vinificazione (Lonvaud-Funel, 1999; Vincenzini *et al.*, 2005).

Questa specie è responsabile di alcune alterazioni dei vini come il filante con produzione di polisaccaridi extracellulari, e dell'amarore con produzione di acroleina dal metabolismo del glicerolo (Vincenzini *et al.*, 2005).

Il genere *Leuconostoc* originariamente consisteva oltre alla specie tipo *Leuc. mesenteroides*, di molte altre specie alcune delle quali sono però state riclassificate e assegnate a diversi generi.

Una prima grossa revisione del genere è avvenuta alla fine degli anni '90, grazie allo studio delle sequenze 16S rRNA che hanno permesso il riconoscimento di 3 distinti gruppi all'interno del genere *Leuconostoc*, risultati che hanno portato alla separazione della specie *Leuc. oenos* diventata *O.oeni* e classificata come un nuovo genere, e la assegnazione a nuovo genere della specie *Leuc. paramesenteroides* diventata *Weissella paramesenteroides* (nuovo genere *Weissella*) (Dick *et al.*, 1995).

Più recentemente questo genere è stato sottoposto a un'altra revisione, con la suddivisione di 3 subcluster: *Leuconostoc sensu stricto*, *Leuc. fructosum* e *Leuc. fallax*. Date le notevoli diversità morfologiche e metaboliche del sub cluster *Leuc. fructosum*, è stata proposta la sua assegnazione a un nuovo genere *Fructobacillus* (Endo e Okadal, 2008).

1.4 I BATTERI LATTICI DELL'UVA

I batteri si trovano già presenti sulla superficie della bacca, la loro concentrazione varia a seconda della fase di sviluppo dell'uva e dalle condizioni climatiche degli ultimi giorni di maturazione, in genere si considera una quantità di circa 10^2 - 10^4 CFU/ml. (Riberau-Gayon *et al.*, 2003). In particolare uno studio condotto sui batteri lattici isolati da diversi vigneti, indica che rispetto alle prime fasi della maturazione dell'uva, i batteri lattici al momento della vendemmia si trovano sulla bacca in concentrazioni superiori, di circa 10^3 CFU/ml (Renouf *et al.*, 2005).

E' noto che i batteri e i lieviti presenti in mosto e nel vino originano dalla vigna e dall'uva e includono, per quanto riguarda i procarioti, il gruppo dei già citati batteri lattici e quello degli acetici (Fleet 1993).

Le principali specie rilevate sull'uva prima della vendemmia sono *L.plantarum*, *L.hilgardii*, *L.casei* e in alcuni casi *O.oeni* che pur essendo la specie tra le più comunemente isolate dal vino, viene raramente isolata dalla bacca probabilmente a causa delle limitazioni insite nei metodi microbiologici classici di isolamento che spesso non permettono di rilevare la presenza di tutte le specie nelle popolazioni naturali (Riberau-Gayon *et al.*, 2003). Uno studio più recente effettuato su uve australiane utilizzando colture arricchite, ha dimostrato la

presenza rilevante in diverse varietà di uva, delle specie *L. mali* e *L. plantarum* ad alte concentrazioni (circa 10^7 - 10^8 CFU/ml) e in sporadici casi di *L. linderi*, *L. kunkeii* (Bae *et al.*, 2006). L'utilizzo della tecnica DGGE ha notevolmente migliorato la capacità di risoluzione della diversità microbica in popolazioni naturali e ha permesso di rivelare specie presenti in basse concentrazioni o specie che non riescono a crescere in condizioni standard di laboratorio e che quindi non venivano mai isolate con altri metodi basati sulla microbiologia classica.

La DGGE si basa sulla separazione di molecole di DNA sfruttando le differenze di stabilità chimica e temperatura di *melting* dovute alle differenze nella sequenze nucleotidica. Per le sue caratteristiche specifiche, questa tecnica è in grado di rilevare anche microrganismi vitali ma non coltivabili su terreni di laboratorio, infatti la DGGE permette una caratterizzazione di popolazioni microbiche direttamente dall'ambiente, senza dover prima isolare i microrganismi, con una riduzione incredibile dei tempi di caratterizzazione.

Le specie di batteri lattici maggiormente rilevati con questo sistema innovativo di analisi sulla superficie della bacca sono state *L. casei*, *Leuc. mesenteroides*, *O. oeni*, *P. parvulus*, *L. sanfranciscensis* (Renouf *et al.*, 2005). Gli autori inoltre considerano la formazione di biofilm la strategia di colonizzazione utilizzata per la colonizzazione della superficie della bacca da parte di lieviti e batteri, struttura che avrebbe l'ulteriore scopo di proteggere i microrganismi dalle aggressioni esterne e di catturare i nutrienti.

1.5 I BATTERI LATTICI NEL VINO

1.5.1 Sviluppo della componente batterica durante la vinificazione

Dati di letteratura, relativi ai processi di vinificazione, mostrano che subito dopo la pigiatura in cantina, i batteri sono presenti in concentrazione variabile, compresa tra 10^2 e 10^4 CFU/ml. Durante le prime fasi della fermentazione alcolica i lieviti e i batteri si moltiplicano contemporaneamente, ma la competizione per i nutrienti (in particolare per la fonte di azoto) fa sì che i lieviti si sviluppino più rapidamente bloccando, di fatto, la crescita batterica. Questi microrganismi cominciano a proliferare a fine fermentazione alcolica quando la lisi cellulare che coinvolge parzialmente la popolazione di lieviti libera composti azotati necessari per la crescita. Durante questa fase, quando la popolazione ha raggiunto una

concentrazione sufficiente, avviene la fermentazione malolattica. A processo concluso, i batteri possono sopravvivere anche per molti mesi se il vino non viene addizionato di SO₂ in quanto possono ricavare l'energia necessaria anche da altri composti organici quali acido citrico, glicerolo, e in minor misura acido tartarico (Riberau-Gayon *et al.*, 2003).

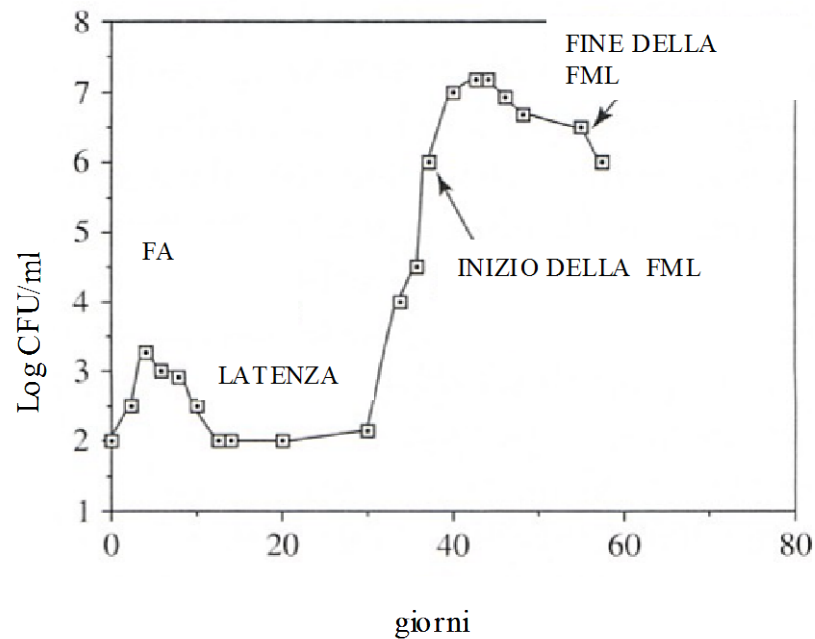


FIG.1.6 Evoluzione della popolazione batterica durante la fermentazione alcolica e malolattica. FA=fermentazione alcolica, FML=fermentazione malolattica

Durate le diverse fasi della vinificazione, generalmente si assiste a una successione delle specie batteriche e presenti, infatti all'inizio (nei mosti appena arrivati nelle vasche) la microflora è più varia e si trovano soprattutto *Leuc. mesenteroides*, *P. damnosus*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. casei*.

Successivamente i microrganismi appartenenti ai genere *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* tendono a scomparire mentre la specie che si afferma, soprattutto in caso di vini particolarmente acidi, è *O. oeni*, più adattato ai pH bassi e alcolicità del mezzo. Nei vini meno acidi invece batteri del genere *Lactobacillus* e *Pediococcus* possono sopravvivere e anche dominare a scapito di *O. oeni* (Lonvaud -Funel 1999).

Giorni	%alcol	<i>O.oeni</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>P.damnosus</i>	<i>L.hilgardii</i>	<i>L.brevis</i>	<i>L.plantarum</i>
0	0	nd	2.9×10^2	6.0×10^2	1.1×10^3	nd	7.5×10^1
3	7	nd	1.7×10^4	3.8×10^4	8.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4
6	9	nd	9.6×10^4	3.7×10^4	4.0×10^4	4.5×10^3	nd
10	13	4.2×10^3	3.2×10^3	4.9×10^3	4.4×10^3	nd	nd
18	13	3.4×10^6	nd	nd	nd	nd	nd

TAB 1.1 Concentrazioni (CFU/ml) delle specie di batteri lattici presenti durante la vinificazione di uva Cabernet Sauvignon. Tratto da Lonvaud-Funel, 1999.

Fattori determinante nella sopravvivenza delle diverse specie sono le interazioni che si verificano non solo tra lieviti e batteri, ma anche tra le diverse popolazioni batteriche. Per quanto riguarda le interazioni tra lieviti e batteri, sono state maggiormente studiate le interazioni tra *S. cerevisiae* e *O. oeni* visto che questa specie batterica è normalmente l'unica che sopravvive alla fine della fermentazione. Le interazioni tra batteri lattici durante la vinificazione non sono ben conosciute ma il meccanismo più probabile con cui specie di batteri si influenzano a vicenda è il rilascio di composti antimicrobici tra cui le batteriocine, prodotte da molte specie di *Lactobacillus* e attive soprattutto contro *O.oeni* (Riberau-Gayon *et al.*, 2003). Infatti sono stati identificati molti ceppi di *L. plantarum* isolati da vino che producono batteriocine attive contro altre specie di batteri lattici presenti nel vino ad es. *L. hilgardii* e *O. oeni* (Rojo-Besarez *et al.*, 2007).





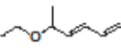




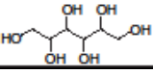
Per contro un recente studio sull'attività antimicrobica di isolati di batteri lattici di origine enologica, ha rivelato che anche altre specie sono in grado di produrre batteriocine soprattutto *O.oeni* e *L. hilgardii*, attive contro altri batteri lattici enologici soprattutto quelli appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus* e *Leuconostoc* (Knoll *et al.*, 2008).

1.5.2 Contaminazioni batteriche e “le malattie del vino”

Se la fermentazione non è condotta in modo appropriato e si verificano carenze nel processo di conservazione, batteri lattici appartenenti a diversi generi possono sopravvivere per molto tempo dopo la fermentazione malolattica utilizzando come

fonte energetica tutta una serie di composti che provocano il rilascio di molecole con effetto deleterio sulle caratteristiche organolettiche e di qualità del vino. La proliferazione di questa microflora contaminante genera in questo modo alterazioni definite tradizionalmente le “malattie del vino”.

In tabella 1.2 sono riassunte le principali malattie del vino e le specie di batteri lattici che provocano la specifica alterazione, è anche indicata la molecola che ne è causa (Bartowsky *et al.*, 2009)

ALTERAZIONE	MOLECOLA		GENERE BATTERI
Acetaldeide	Acetaldeide		<i>Acetobacter, Gluconobacter</i>
Acidità volatile	Acido acetico		<i>Acetobacter, Gluconobacter, LAB</i>
Spunto d'aceto	Etil acetato		<i>Acetobacter, Gluconobacter, LAB</i>
Sentore di burro	2,3-utandione (diacetile)		<i>Oenococcus, Lactobacillus</i>
Nota di geranio	2-etossi 3,5 esadiene		<i>Lactobacillus, Pediococcus</i>
Gusto di topo	2-acetil-tetraidropiridina		<i>Lactobacillus, Oenococcus</i>
Gusto di topo	2-etiltetraidropiridina		<i>Lactobacillus, Oenococcus</i>
Gusto di topo	2-acetil-1-piridina		<i>Lactobacillus, Oenococcus</i>
Amarore	Acroleina		<i>Lactobacillus, Pediococcus</i>
Filante-viscosità	B-glucani (esopolisaccaridi)		<i>Pediococcus</i>
Agrodolce	mannitolo		<i>Oenococcus</i>

TAB 1.2 Composti prodotti da batteri contaminanti causa delle principali malattie del vino e le specie batteriche che le determinano. Tratto da Bartowsky *et al.*, 2009

Verranno di seguito descritte le principali alterazioni con particolare riguardo a quelle provocate dai batteri lattici (Vincenzini *et al.*, 2005).

- 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 la 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 alto pH e elevate quantità di zucchero residuo come fruttosio.
- 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 *et al.*, 2009).
- Sentore di burro. E' causato dalla produzione di diacetile, composto con una soglia di percezione molto bassa (0,1-2mg/l) che 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 eterofementanti e *O. oeni*. Ha una soglia di percezione sensoriale bassa, di circa 0,1 µg/l (Bartowsky *et al.*, 2009).
- 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).
- Amarore. 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 *Leuc. mesenteroides* e specie del genere *Lactobacillus* che possiedono il corredo enzimatico per metabolizzare il glicerolo (Vincenzini *et al.*, 2005).

Infine rientra tra i difetti del vino la presenza di amine biogene: non si tratta di un'alterazione che influenza la qualità del prodotto finito ma può costituire un rischio per la salute del consumatore.

Le amine biogene sono basi organiche a basso peso molecolare che derivano dalla decarbossilazione degli aminoacidi. Possono causare emicrania, ipertensione e allergie e problemi respiratori e cardiaci se presenti in alte concentrazioni nei vini. 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 amine biogene più importanti nei vini sono istamina, putrescina, tiramina che derivano dagli aminoacidi più diffusi nel vino e cioè rispettivamente istidina, arginina e ornitina, tirosina. (Lonvaud-Funel, 1999).

Le amine biogene si trovano ad alte concentrazioni dopo la fermentazione malolattica perché vengono prodotte da ceppi di batteri malolattici che in mancanza di altri substrati da metabolizzare (zuccheri), utilizzano gli aminoacidi come fonte energetica. Il metabolismo degli aminoacidi ha anche la funzione di facilitare la tolleranza dei batteri all'ambiente acido grazie alla produzione di ammoniaca che aumenta il pH del mezzo.

Visto il notevole interesse verso questi composti, numerosi studi sono stati condotti per verificare la produzione di amine biogene da parte di batteri lattici isolati dai vini e anche per individuare la presenza dei *pool* enzimatici specifici che intervengono nella degradazione degli aminoacidi responsabili. Molti batteri lattici sono in grado di produrre amine biogene, questa capacità varia da un ceppo all'altro in quanto dipende dalla presenza di trasportatori di aminoacidi sulla membrana plasmatica e degli enzimi specifici di decarbossilazione e di deaminazione.

L. plantarum è in grado di degradare l'arginina grazie alla presenza di geni specifici che codificano per gli enzimi arginina deaminasi. Questa via metabolica è illustrata in figura 1.7 Durante la prima fase di degradazione vengono prodotte innanzitutto citrullina e ornitina, precursori della putrescina che può essere prodotta per decarbossilazione. Viene anche prodotto un importante precursore di etilcarbammato, il carbammil fosfato (Spano *et al.*, 2004). *L. plantarum* è anche in grado di produrre tiramina ed è stata dimostrata la presenza dei geni per la decarbossilazione della tirosina (Arena *et al.*, 2007).

Molte specie di batteri lattici producono istamina in vino, tra cui soprattutto *O. oeni* e *L. hilgardii* per i quali è stata dimostrata la presenza dell'enzima istidina decarbossilasi, queste due specie sono anche in grado di produrre etilcarbammato dalla degradazione dell'arginina (Lonvaud-Funel 1999).

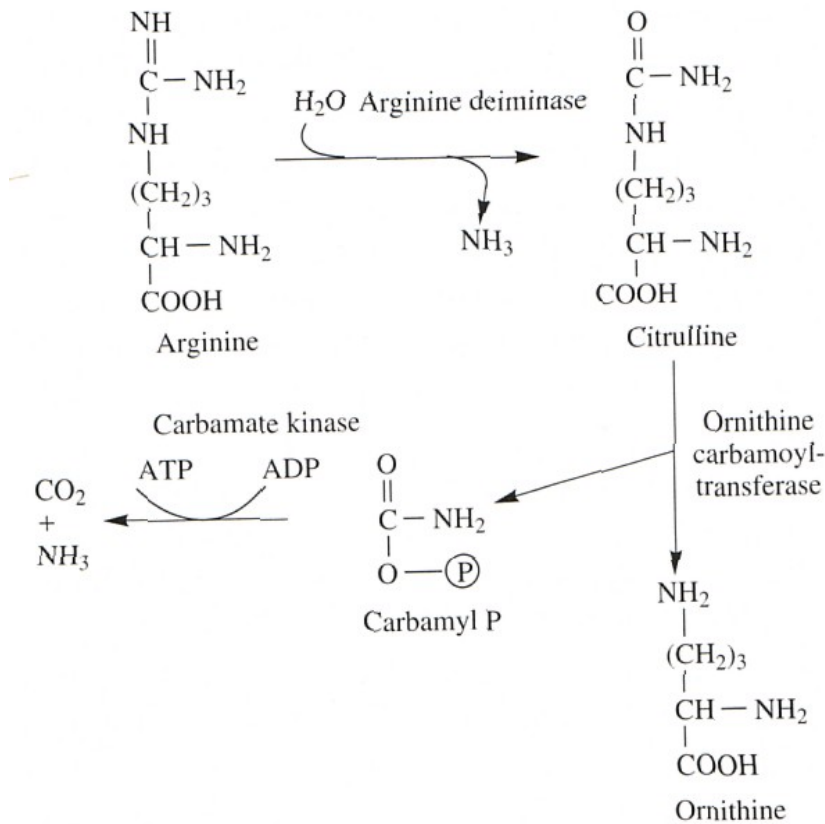


FIG. 1.7 Metabolismo dell'arginina con produzione diretta di ammoniaca, ATP, di precursori dell'etilcarbammato (carbamyl-P) e dell'amina biogena putrescina (ornitina).

1.6 I BATTERI LATTICI E LA VINACCIA

1.6.1 La vinaccia: definizione e classificazione

La legislazione italiana definisce vinaccia il residuo solido dell'uva che si ottiene dopo l'estrazione del succo durante il processo di vinificazione e comprende bucce, vinaccioli e in alcuni casi raspi. Questi componenti rappresentano il 10-20% della massa totale dell'uva. La vinaccia viene comunemente utilizzata per produrre la grappa mediante distillazione diretta.

Analizzando il loro potenziale alcolico, le vinacce possono essere differenziate in 3 diverse tipologie, vinacce vergini, fermentate e parzialmente fermentate:

- Le vinacce vergini provengono da vinificazioni nelle quali le parti solide vengono allontanate dal mosto appena completata la pigiatura dell'uva (vinificazione in bianco) e quindi non contengono alcol ma solo zuccheri.

- Le vinacce fermentate iniziano e completano la fermentazione alcolica insieme con il mosto durante la vinificazione “in rosso”, pur conservando qualche residuo zuccherino. Quindi, esse partecipano alla caratterizzazione del futuro vino e acquisiscono, d’altro canto, vinosità e sapori non riscontrabili nelle vinacce vergini.
- Le vinacce parzialmente fermentate presentano caratteristiche intermedie rispetto alle precedenti. E’ necessario fare un’ulteriore distinzione tra le vinacce semifermentate nel proprio mosto-vino e quelle che, in assenza del liquido, hanno portato avanti parzialmente una dannosa fermentazione nei silos di stoccaggio in attesa del trasporto in distilleria. Le prime generalmente sviluppano solo un 20-30 % del loro grado alcolico potenziale e sono soggette a possibili degradazioni e perdite di alcol durante le fasi di lavorazione; nonostante ciò possono comunque essere considerate una materia prima di discreto livello. Le seconde, invece, possono seriamente pregiudicare la possibilità di ottenere un distillato di buona qualità in quanto in esse non si verifica una fermentazione, ma una vera e propria combustione degli zuccheri che dà origine a composti organoletticamente sgradevoli a scapito dello sviluppo di alcol (De Rosa e Castagner, 1994).

1.6.2 Composizione chimica della vinaccia

La composizione chimica della vinaccia è piuttosto complessa e varia a seconda di fattori quali l’andamento stagionale, il luogo di provenienza, la varietà del vitigno, il periodo della vendemmia e la diversa tecnica di vinificazione.

La composizione media può essere considerata la seguente:

acqua 50-70%
 zuccheri 6-8%
 acidi organici 1-2%
 tannini 1-2%
 sostanze minerali 1-2%
 cellulosa 10-20%
 grassi 2-4%

La maggior parte dei composti presenti nella vinaccia e che poi andranno a caratterizzare la grappa, provengono dalla buccia. Possiamo quindi riferirci alla

composizione delle bucce per descrivere i composti chimici delle vinacce (De Rosa e Castagner, 1994).

- L'acqua è presente in grande quantità, la sua percentuale dipende dallo stato di maturazione al momento della raccolta e dalle condizioni vegetative in cui la pianta si trova. La quantità d'acqua della vinaccia è un parametro diverso dal valore dell'umidità di queste, il quale risente della presenza di mosto. Le vinacce migliori sono quelle non completamente pressate, ricche in liquido vinoso, con un grado di umidità che varia dal 55 al 70%, che consente di sfruttare meglio il materiale vegetale estraendo le caratteristiche organolettiche dal vitigno (Ruberto *et al.*, 2008).
- Gli zuccheri presenti nelle vinacce sono il glucosio e il fruttosio in pari concentrazione, anche se i lieviti nella demolizione glucidica attaccano preferibilmente il glucosio trasformandolo in alcol etilico, con un rendimento teorico del 60 %.
- Rispetto al mosto, le vinacce presentano minore acidità titolabile ed un più elevato valore di pH. L'acidità fissa (1-2 %) è per lo più dovuta all'acido tartarico (non fermentato né dai lieviti né dai batteri) e in minor misura agli acidi malico, citrico, succinico in gran parte salificati da potassio, calcio e magnesio. Il grado di acidità dipende dalla varietà dell'uva, dall'andamento stagionale (annate piovose corrispondono a valori più alti di pH) e dalla quantità di mosto che rimane inglobata nelle vinacce.
- I tannini sono polifenoli che rivestono un ruolo primario in enologia. Durante la vinificazione vengono estratti dalle differenti parti dell'acino in cui risiedono (nelle bucce in percentuale compresa tra l'1 e il 2 %, nei vinaccioli 5-6 %), e subiscono variazioni di struttura nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino. I composti fenolici si suddividono dal punto di vista chimico in quattro categorie: acidi fenolici e loro derivati, flavoni, antociani, tannini (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003)
- Le sostanze pectiche presenti nella buccia, sono costituite da lunghe catene lineari di condensazione di acido galatturonico, le cui funzioni acide sono in parte libere ed in parte esterificate con gruppi metilici.

L'azione enzimatica della pectin-metil-esterasi di origine vegetale durante il periodo di stoccaggio, favorita dalle temperature di fermentazione e di distillazione, può contribuire a liberare una frazione elevata di alcol

metilico. La presenza di alcol metilico nelle vinacce è influenzata pertanto dalle modalità d'insilamento (si forma più rapidamente nelle uve bianche che nelle rosse), dal metodo di lavorazione in cantina e dal tipo di vitigno (nelle vinacce Pinot e Chardonnay è presente in quantità tra 1,5-1,8 ml/100 ml a.a.).

- La cellulosa è un altro componente importante, infatti il 10-20 % delle bucce è composto da cellulosa, un polisaccaride e più precisamente un polimero del β -glucosio. Le fibre di cellulosa sono costituite da fasci di catene polisaccaridiche parallele unite da legami idrogeno tra i gruppi ossidrilici su catene adiacenti. Questo tipo di struttura conferisce alle fibre di cellulosa un'elevata resistenza meccanica.

Una componente molto importante delle vinacce sono le sostanze aromatiche che si trovano in dosi maggiori nelle bucce rispetto al succo dell'acino.

Gli strati più interni della buccia sono sede della maggior parte degli aromi varietali o primari, molecole odorose come linalolo (responsabile dell'aroma del vino Moscato), nerolo, citronellolo e geraniolo appartenenti per lo più alla famiglia dei terpeni. Questi, pur avendo un punto di ebollizione elevato (dai 150°C ai 198°C), sono in grado di passare dalla vinaccia all'acquavite rendendola riconoscibile organoletticamente (De Rosa. e Castagner, 1994; Odello, 1997). Non tutti i vitigni posseggono molecole aromatiche e questo consente la distinzione tra varietà a frutto neutro e varietà a frutto aromatico come Moscato, Malvasia, Müller Thurgau, Riesling, Silvaner, Sauvignon e Traminer. La dotazione aromatica delle uve dipende anche dalla fase di maturazione e dall'andamento stagionale, in particolare le annate piovose influiscono negativamente sul livello dei terpeni.

I terpeni, sostanze aromatiche primarie localizzate negli strati più interni dell'epicarpo, si ritrovano, per il loro elevato punto di ebollizione, nelle code del distillato. Reazioni di ossidazione che possono intervenire durante la fermentazione alcolica possono modificare queste molecole aromatiche, producendo composti completamente privi di interesse organolettico ed un prodotto alquanto scadente.

Gli aromi secondari che evaporano soprattutto nelle prime fasi della distillazione e in quelle finali, sono costituiti da alcuni alcoli, esteri, acidi, aldeidi e chetoni, prodotti durante la fermentazione alcolica o dai lieviti. Tra questi, i maggiori

responsabili di ciò che viene definito aroma secondario dei distillati sono sicuramente gli alcoli superiori e gli esteri etilici di alcuni acidi grassi a corta e media catena, saturi e insaturi (Ruberto *et al.*, 2008).

1.6.3 Il distillato di vinaccia: la grappa

Le bevande spiritose ottenute dalle vinacce fermentate sono molto popolari in Europa e soprattutto nei paesi Mediterranei: molte nazioni producono distillati tradizionali come il tsipouro e tsikoudia greco, i portoghesi bagaceiras e aguardiente, il francese eau-de-vie de marc e la grappa italiana.

In particolare la grappa viene definita come l'acquavite di vinaccia (un sottoprodotto del processo di vinificazione) ottenuta da materie prime ricavate da uve prodotte e vinificate in Italia e viene regolata la sua produzione dal Regolamento CEE n. 1576/89.

Il nuovo regolamento europeo CE 110/08 ha apportato delle sostanziali e importanti modifiche al precedente regolamento che definiva la grappa, in particolare ha introdotto la indicazione geografica della grappa, nel senso che il nostro distillato potrà essere indicato solo come grappa per intendere una grappa italiana. Inoltre il nuovo regolamento introduce la necessità di redigere delle schede tecniche per ciascuna delle grappe indicate tra cui anche quella veneta. Questa innovazione va nella direzione della certificazione del prodotto grappa veneta che potrà permettere al distillato di avere una sua identità in tutto il mondo. La precedente normativa consisteva nel Regolamento CEE del 1989 è stato poi recepito da un decreto del Presidente della Repubblica nel 1997 con cui si stabilivano nei particolari le norme di produzione e di designazione: la distillazione deve essere effettuata in impianti ubicati sul territorio nazionale, direttamente mediante vapore acqueo o dopo aggiunta, nell'alambicco, di vinacce fermentate o semifermentate. Le acquaviti risultanti dal processo di distillazione e di eventuali distillazioni di affinamento, per poter essere immesse al consumo, devono avere un titolo alcolometrico non inferiore al 37,5% in volume né superiore all' 86%. Il tenore in sostanze volatili (ossia quelle diverse dall'acqua e dagli alcoli etilico e metilico) non deve essere inferiore a 140 mg/100ml di alcol puro e la quantità di alcol metilico non superiore a 1 g/100ml di alcol puro (Da Porto *et al.* 2006).

Nella preparazione della grappa è consentito l'impiego di fecce naturali di vino, che sedimentano nel fondo delle cisterne dopo il travaso, in quantità non superiore

al 35% del contenuto finale in etanolo della bevanda e il 25% in peso sulla materia prima (Da Porto, 2002). Sono ricche di frammenti di tessuti vegetali, lieviti, batteri, ed etere enantico che conferisce un sapore vinoso. E' consentita l'aggiunta di zuccheri (con un massimo di 20 g/l) e di caramello, solo per la grappa sottoposta ad invecchiamento di almeno 12 mesi.

1.6.4 Il ciclo produttivo della grappa

Il ciclo di produzione della grappa inizia in cantina, dove ha luogo la vinificazione: dopo la raccolta e la pigiatura dell'uva, il mosto viene separato dalle vinacce composte essenzialmente di bucce, vinaccioli, residui di polpa e talvolta raspi. Nel caso della vinificazione in rosso, la separazione delle vinacce avviene dopo la macerazione quando la fermentazione è già cominciata, pertanto esse contengono alcol e pochi zuccheri. Al contrario, le vinacce ottenute dalla vinificazione in bianco contengono zuccheri non ancora fermentati. Per questo motivo, il materiale vegetale conferito alla distilleria viene conservato in diversi modi per un periodo variabile da pochi giorni a parecchie settimane favorendo così la formazione di alcol. Successivamente ha luogo la distillazione che è in sintesi l'operazione che porta all'estrazione dell'alcol e dei principi aromatici della vinaccia, concentrando il primo di 20-30 volte (partendo da vinacce con gradazione sui 3-4 gradi alcolici) e selezionando i secondi mediante un opportuno taglio delle teste e delle code.

Alla fine del processo il distillato, caratterizzato da un contenuto alcolico pari al 70-80 %, viene immagazzinato all'interno di recipienti in acciaio e vetroresina, dotati di agitatori termici che favoriscono l'ossigenazione e mantengono la temperatura a valori costanti.

Prima dell'imbottigliamento vengono eseguite delle analisi per accertare le caratteristiche stabilite dalla legislazione. Il titolo alcolometrico volumico per il consumo, compreso tra i 40°-60°, è ottenuto mediante diluizione con acqua demineralizzata (D.P.R n. 236/1988). Segue un periodo di refrigerazione, che comporta un intorbidimento della grappa dovuto all'insolubilizzazione della frazione aromatica rancido-oleosa, a temperature variabili da -20 °C a 0 °C in relazione al tipo di distillato (grasso, delicato, aromatico, semi-aromatico o neutro). Per eliminare l'intorbidimento sono necessarie le operazioni di filtrazione e chiarifica, trattamenti che possono però asportare quote significative di profumi

e di impurità essenziali al bouquet, ma non eliminano difetti derivanti da uno scorretto insilamento delle vinacce. Una volta resa brillante e cristallina, la grappa è sottoposta ad imbottigliamento; il prodotto finito va stoccato per un periodo di riposo e di recupero organolettico non inferiore ai sessanta giorni e solo dopo può essere immesso nel mercato.

Nel caso di grappe invecchiate o aromatizzate è necessario un periodo di maturazione in recipienti di legno non inferiore ai 12 mesi. Durante l'invecchiamento hanno luogo dei fenomeni chimico-fisici: il distillato è in grado di estrarre dal legno sostanze polifenoliche e avviare reazioni di etanolisi a carico della lignina, un polimero fenolico simile alla plastica (potere solvente dell'alcol). Si possono verificare inoltre reazioni ossidative favorite dalla permeabilità del legno all'ossigeno e processi di evaporazione di piccole molecole.

1.6.5 Insilamento della vinaccia

Il passaggio più importante del ciclo produttivo della grappa è l'insilamento, infatti il materiale vegetale viene stoccato in cantina per un periodo variabile da pochi giorni a alcuni mesi prima di essere distillato. Ciò accade perché non è sempre possibile distillare immediatamente la vinaccia conferita dalle cantine alle distillerie, inoltre il periodo di conservazione permette la fermentazione degli zuccheri residui nelle vinacce vergini. Dalla metodica di conservazione e dal tempo di durata dello stoccaggio dipendono le caratteristiche del prodotto finito: durante lo stoccaggio la vinaccia subisce a seguito del metabolismo microbico, una serie di modifiche che influenzano la qualità della grappa.

Per ridurre le perdite di fragranza, del grado alcolico ed in particolare, per impedire l'innescò di dannose fermentazioni batteriche, è necessario limitare il tempo di insilamento delle vinacce e controllare l'andamento dei parametri chimico-fisici durante lo stoccaggio; in questo modo è possibile ottenere composti di grande interesse organolettico originati da un'equilibrata e corretta fermentazione alcolica (Odello , 1997).

Sistemi di conservazione

Sono stati sperimentati diversi sistemi di conservazione; quelli maggiormente utilizzati (Odello *et al.*, 1997) sono:

- **Contenitori aperti in cemento:** è il sistema più tradizionale che prevede l'utilizzo di "vasconi" interrati o sopraelevati, chiusi su tre, quattro o cinque lati. I silos interrati presentano aspetti negativi quali le difficoltà di pulizia e di estrazione delle vinacce, ma anche una fermentazione maggiore per effetto coibente del terreno. Nel secondo caso si utilizzano ruspe sia per la stratificazione sia per la compressione avendo l'accortezza di creare una cunetta nei punti di contatto tra la parete e le vinacce. Infine, queste ultime vengono ricoperte con teli di nylon ben tesi e bloccati da cumuli di sabbia, allo scopo di evitare il contatto con l'aria.
- **"Grappa - system",** utilizzati sia per piccole partite di pregio sia in sostituzione di altre metodologie, con lo scopo di conservare aroma e freschezza. Si tratta di lunghi tunnel orizzontali nei quali la vinaccia viene spinta e compressa da una macchina ad avanzamento automatico, consentendo così di ottenere condizioni di severa anaerobiosi ed eventuali pratiche di acidificazione ed inoculo della vinaccia con lieviti selezionati (Da Porto, 2002). L'intero sistema, permette alle distillerie di gestire in modo ottimale gli spazi anche in periodi di grande afflusso di vinaccia dalle cantine.
- **Contenitori cilindrici o cubici:** di piccole dimensioni (150-700 kg) chiusi con coperchio o nel caso dei più grandi con film plastico ricoperto di sabbia.
- **Serbatoi in acciaio inox:** dotati di dispositivi meccanici automatizzati per il loro riempimento e svuotamento; consentono una buona conservazione delle vinacce per tempi brevi e minori perdite di alcol (De Rosa e Castagner, 1994). La compressione soffice delle vinacce causa però incameramento d'aria e si verifica un'eccessiva velocità di fermentazione.



FIG. 1.8 Sacchi di nylon per la conservazione della vinaccia.

Modificazioni della vinaccia durante l'insilamento

L'insilamento rappresenta un passaggio critico nel ciclo produttivo della grappa in quanto la qualità del prodotto finito è largamente influenzata dalle trasformazioni che subisce durante lo stoccaggio della vinaccia. Durante questo periodo possono avvenire molte reazioni biochimiche dovute all'attività microbica: la fermentazione alcolica degli zuccheri e la produzione di composti aromatici che influenzano la qualità del prodotto finito. In questi processi hanno un ruolo fondamentale i lieviti con la fermentazione alcolica e i batteri che sono spesso associati alla produzione di sostanze contaminanti o di composti volatili che influenzano la qualità del prodotto finito.

Alcune alterazioni della grappa dovute a contaminazione da parte della microflora sono ad esempio il gusto amaro causato dalla formazione di acido butirrico e acido propionico durante lo stoccaggio della vinaccia; oppure l'odore di muffa causato ovviamente dalla presenza di muffe nelle vinacce; l'odore acetoso invece è provocato dallo sviluppo di batteri acetici nelle vinacce per cui la grappa contiene forti quantità di acetato di etile e di acetaldeide; infine l'odore di uova marce quando le vinacce hanno subito fermentazioni anomale con produzione di idrogeno solforato e di mercaptani.

In distilleria è pertanto necessario attuare una serie di procedure per ottimizzare la conservazione della vinaccia ed evitare la produzione di sostanze indesiderate da parte di microrganismi con scarse attitudini alla fermentazione.

In primo luogo è necessario creare delle condizioni di anossia in modo da ridurre la proliferazione batterica soprattutto dei batteri acetici e delle muffe e a tal fine è prassi comune pressare la vinaccia sia nei contenitori di cemento che nei sistemi automatici come il "grappa system".

Alcune moderne distillerie utilizzano poi delle tecnologie innovative per evitare lo sviluppo incontrollato della microflora durante l'insilamento della vinaccia.

Ad esempio l'acidificazione della vinaccia è una pratica che viene condotta da diversi anni, soprattutto da quando l'operazione è resa agevole dall'utilizzo del "grappa system" che automaticamente miscela l'acido e pressa in modo ottimale la vinaccia. L'acidificazione è stata introdotta in alcune distillerie seguendo l'esempio di quanto avviene nelle cantine, dove questa pratica è largamente diffusa e ha lo scopo di impedire lo sviluppo incontrollato dei batteri. In realtà non esistono al momento evidenze sperimentali che testimonino l'effetto

dell'abbassamento del pH sulla microflora, in particolare sulla componente batterica.

Un'altra tecnica applicata in distilleria è l'inoculo di ceppi di lievito selezionati. Tale pratica viene attuata allo scopo di condurre la fermentazione alcolica nel modo più efficiente possibile e anche per inibire lo sviluppo della microflora indigena che potrebbe condurre a fermentazioni lente o anomale con produzione di composti che possono pregiudicare la qualità della grappa. Infatti l'elevata concentrazione cellulare dell'inoculo normalmente impedisce la crescita degli altri lieviti indigeni e anche di batteri contaminanti.

Infine tra le tecniche che ottimizzano la conservazione della vinaccia possiamo annoverare la refrigerazione del materiale vegetale. La temperatura della vinaccia è un parametro molto importante che influenza lo sviluppo della microflora in quanto si osserva il rallentamento della crescita di batteri e lieviti in condizioni di bassa temperatura. Il controllo della temperatura è importante non solo in distilleria ma anche durante il trasporto della vinaccia dalla cantina: in questa fase infatti possono già avvenire delle reazioni chimiche che portano essenzialmente alla riduzione del contenuto di alcool per la perdita di etanolo durante la fermentazione alcolica. Per ovviare a questo problema alcune distillerie utilizzano dei camion refrigerati adibiti al trasporto della vinaccia. Una volta giunta in distilleria, la vinaccia viene normalmente conservata a temperatura ambiente vista la difficoltà e il notevole costo di disporre di contenitori refrigerati che accolgano la massa vegetale.

1.6.6 La microflora della vinaccia

Così come la composizione chimica della vinaccia rispecchia quella della buccia dell'uva da cui è composta, anche i microrganismi presenti in vinaccia sono quelli originariamente presenti sulla superficie della bacca. Così come già accennato, sulla superficie dell'acino è presente una microflora costituita prevalentemente da lieviti ma anche da muffe e da batteri lattici ed acetici, la cui popolazione risente delle condizioni atmosferiche, delle condizioni di salute della pianta e dell'acino, del grado di maturazione della bacca.

Ad oggi le informazioni sulla microflora in vinaccia destinata alla produzione di Grappa sono ancora carenti; in letteratura si ritrovano pochi dati e per lo più

relativi alla popolazione di lieviti o alla sola categoria dei batteri lattici (De Pina e Hogg, 1999).

1.6.6.1 I lieviti

I lieviti sono funghi unicellulari aventi forma sferica, ovale o ellittica; talvolta si presentano sotto forma di ife filamentose dette pseudomicelio. Le loro dimensioni si aggirano sui 5-30 μm di lunghezza e 1-5 μm di larghezza.

Secondo l'attuale tassonomia i lieviti si collocano nel complesso Regno dei Funghi all'interno del phylum Mycota, e in base alla modalità di riproduzione sessuale si suddividono all'interno delle classi di Ascomyceti e Basidiomyceti.

In generale sono pochi i lieviti riscontrati sugli acini immaturi, $10\text{-}10^3$ UFC/g, ma con la maturazione e fino alla vendemmia, quando gli zuccheri diffondono sulla superficie, la popolazione raggiunge le $10^4\text{-}10^6$ UFC/g.

Sui grappoli immaturi predominano i generi *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, e *Candida*, oltre a *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, *Filobasidium* che sono presenti in generale nell'ambiente vigneto (suolo, foglie, corteccia). Questi si ritrovano anche nei grappoli maturi, ma in minor quantità rispetto ai lieviti apiculati a metabolismo ossidativo *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, che sembra dominano anche sui frutti danneggiati, assieme ai generi *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*.

Il principale agente della fermentazione *Saccharomyces cerevisiae* non è presente oppure viene rilevato a bassissime concentrazioni sul grappolo (Fleet, 2003).

1.6.6.2 I batteri acetici

Sono chiamati acetici quei batteri dotati di intenso metabolismo ossidativo che metabolizzano gli zuccheri e l'etanolo per via ossidativa e producono acido acetico. Gli acetobatteri sono batteri Gram negativi, di dimensioni 0,5-0,8 μm x 1-4 μm circa. Hanno forma bastoncellare o ellissoidale, disposti singolarmente, a coppie o in catene. Alcuni ceppi di *Acetobacter* possono sviluppare una pseudoifa semplice dove una o più cellule appaiono allungate come una ifa delle muffe. Sono aerobi obbligati e catalasi positivi.

Questi microrganismi sono diffusi in ambienti contenenti zuccheri, alcool e acidi, come nella birra, nel vino, nell'aceto, sidro e nella produzione di cibi fermentati .

Sebbene i batteri acetici siano stati descritti per la prima volta da Pasteur negli anni 1850, a tutt'oggi sono difficili da coltivare in vitro e la loro tassonomia è ancora piuttosto incerta.

I batteri acetici appartengono alla famiglia delle *Acetobacteraceae* che comprende i generi *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas* e il recentemente descritto nuovo genere *Asaia* (Bartowsky e Henschke, 2008).

Recentemente la tassonomia di questo gruppo è in fase di revisione infatti nuove specie vengono descritte soprattutto per il genere *Acetobacter* (Cleenwerck *et al.*, 2002; De Vuyst *et al.*, 2008).

I generi associati all'uva e al vino sono *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*.

Le specie più frequenti in ambito enologico appartengono ai generi *Acetobacter* e *Gluconobacter* e in particolare sono: *G.oxydans*, *A. aceti* e *A.pasteurianus* (Bartowsky e Henschke, 2008).

Entrambi i generi hanno la capacità di ossidare l'etanolo in acido acetico ma in *Acetobacter* a differenza di quanto avviene in *Gluconobacter* l'ossidazione degli acidi organici acetico e lattico prosegue fino all'ottenimento di anidride carbonica e acqua (Vincenzini *et al.*, 2005).

Nei mosti e nelle uve viene isolato principalmente *Gluconobacter* perché predilige substrati con zuccheri ed è sensibile all'etanolo, mentre nei vini o nei mosti in fermentazione viene prevalentemente isolato *Acetobacter*.

Nei vini questi microrganismi sono considerati contaminanti perché la elevata concentrazione di acido acetico che producono comporta gravi alterazioni rendendo sgradevole il vino, difetto noto come acidità volatile. Altre alterazioni dei vini causate da questi microrganismi sono la produzione di acetaldeide e di acetoino (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.6.6.3 I batteri lattici: il loro possibile ruolo in vinaccia

Come per i lieviti e i batteri acetici, anche i batteri lattici della vinaccia provengono in maggioranza dalla buccia dell'acino e quindi possiamo considerare che la microflora presente sulla bacca e descritta nel paragrafo 1.4, possa essere realisticamente molto simile alla popolazione di batteri lattici delle vinacce.

L'unico lavoro a tutt'oggi pubblicato a riguardo di questo argomento è quello di De Pina e Hogg del 1999.

In conclusione di questo capitolo introduttivo si vuole porre l'accento sul ruolo che questi batteri possono avere in vinaccia e la loro importanza per la qualità del distillato che ne deriva.

Se i lieviti sono responsabili della fermentazione alcolica che permette la trasformazione dello zucchero in alcool, i batteri acetici sono responsabili dell'acescenza provocando difetti ben noti, quale è il ruolo dei batteri lattici, l'altra classe di batteri presenti in vinaccia? Sicuramente essi sono collegati a una nozione negativa, perché dal loro metabolismo liberano composti volatili che causano odori sgradevoli, ad esempio i fenoli volatili.

Inoltre i batteri lattici con il loro metabolismo dell'azoto possono produrre composti contaminanti dal punto di vista igienico, come le amine biogene.

Infine i batteri lattici come è stato precedentemente illustrato, convertono gli zuccheri in acido lattico comportando una riduzione del pH e conseguentemente rendono il materiale vegetale meno attaccabile da parte di altri microrganismi potenzialmente contaminanti.

Inoltre alcuni batteri lattici enologici producono molecole che inibiscono in modo selettivo lo sviluppo di microrganismi patogeni o contaminanti, ad esempio attraverso il rilascio delle batteriocine: in questo modo questi batteri potrebbero avere un ruolo "protettivo" della vinaccia.

1.7 SCOPI DELLA TESI

Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di un più ampio progetto che prevede lo studio delle popolazioni di lieviti e batteri presenti nella vinaccia destinata alla produzione di grappa.

Lo scopo principale di questo lavoro di tesi è la caratterizzazione della popolazione batterica presente in vinaccia di Prosecco destinata alla produzione della grappa. La grappa è un importante prodotto tipico italiano e in particolare caratteristico della Regione Veneto, un prodotto che negli ultimi anni sta acquistando uno spazio sempre più vasto nel mercato internazionale non solo come prodotto correlato al vino ma come distillato di grande peculiarità e di grande livello qualitativo. Il raggiungimento di un alto livello qualitativo dipende in buona parte dal materiale di partenza e in particolare dalla microflora della vinaccia da cui si ottiene la grappa.

Vista la scarsità di dati scientifici in merito alla componente microbiologica della vinaccia, il primo obiettivo che ci siamo posti è stato quello di analizzare dal punto di vista quantitativo e qualitativo la microflora batterica isolata dalla vinaccia di Prosecco, attraverso l'utilizzo di metodi di microbiologia classica e metodi molecolari.

La vinaccia di Prosecco infatti è detta vergine come tutte le vinacce da uva bianca, perché necessita di un periodo di insilamento durante il quale avviene la fermentazione degli zuccheri per la produzione di alcol. Durante questo periodo di stoccaggio avvengono una serie di processi metabolici dovuti all'attività di lieviti e di batteri indigeni, se la fermentazione alcolica condotta dai lieviti è essenziale per la formazione dell'alcol, il metabolismo dei batteri invece può portare allo sviluppo di composti aromatici sgradevoli che possono influenzare negativamente la qualità del distillato.

Nelle moderne distillerie vengono utilizzate delle tecnologie di conservazione della vinaccia che hanno lo scopo di ridurre lo sviluppo della microflora indesiderata, quindi soprattutto i batteri acetici e lattici, non ci sono però a tutt'oggi evidenze sperimentali dell'effetto di questi trattamenti sulla microflora.

Pertanto un secondo obiettivo di questo lavoro è stato quello di studiare l'effetto di alcuni trattamenti tecnologici impiegati per la conservazione della vinaccia, come la refrigerazione, l'acidificazione della massa vegetale e l'inoculo di un lievito commerciale sulla microflora indigena. È stato valutato l'effetto di questi

trattamenti sulla carica microbica e sulla composizione qualitativa della popolazione batterica durante tutto il periodo di insilamento della vinaccia.

Le dinamiche della componente batterica sono state confrontate con quelle dei lieviti isolati dalla vinaccia di Prosecco, per capire l'evoluzione dei diversi microrganismi nella vinaccia durante lo stoccaggio.

Una volta analizzata la composizione della microflora batterica, è stato approfondito lo studio della popolazione dominante nella vinaccia, allo scopo di caratterizzare questa popolazione sia dal punto di vista genetico che dal punto di vista fisiologico per comprenderne il grado di biodiversità.

La caratterizzazione fisiologica della popolazione dominante nella vinaccia naturale ha inoltre avuto un altro obiettivo e cioè quello di individuare eventuali proprietà tipiche che possano spiegare le dinamiche della popolazione e la sua dominanza della microflora della vinaccia.

Infine, attraverso la caratterizzazione fisiologica della popolazione batterica prevalente, si è voluto anche indagare eventuali proprietà interessanti con possibili applicazioni tecnologiche anche al di fuori del sistema vinaccia, ad esempio in ambito enologico o in altri sistemi fermentanti di origine vegetale. Sono stati a tal scopo analizzati l'attività antimicrobica e la capacità di formare biofilm in quanto si tratta di due proprietà tipiche di molti batteri lattici che possono essere importanti per l'affermazione di una specie in vinaccia.

**2 ISOLAMENTO, IDENTIFICAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI BATTERI DA
VINACCIA SOTTOPOSTA A DIVERSI TRATTAMENTI
TECNOLOGICI**

2.1. INTRODUZIONE

Questo lavoro di tesi rappresenta il primo studio microbiologico condotto sulla componente batterica della vinaccia italiana impiegata per la produzione di grappa e rappresenta un punto di partenza per lo sviluppo di strategie per il miglioramento della qualità del prodotto finale. Il lavoro ha riguardato la caratterizzazione con metodi microbiologici classici e con metodi molecolari, di popolazioni batteriche naturali che si sviluppano durante la fermentazione di vinacce ottenute da uva Prosecco, varietà d'uva bianca tipica della regione Veneto.

L'unico studio attualmente pubblicato sull'argomento è quello di De Pina e Hogg (1999) sulla componente microbica della vinaccia utilizzata per la produzione di un tipico distillato portoghese. In quel caso però è stato monitorando l'andamento della popolazione di lieviti e batteri lattici durante il periodo di insilamento solamente con metodi di microbiologia classica. In questo lavoro di tesi invece, sono stati combinati metodi di microbiologia classica per l'isolamento e la determinazione quantitativa della microflora con metodi molecolari per l'identificazione della popolazione batterica.

2.1.1. Caratterizzazione di batteri enologici

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 caratteri morfologici, fisiologici e biochimici, la tassonomia molecolare classifica i batteri attraverso la valutazione del grado di similarità tra i loro genomi o particolari tratti di questi. I più utilizzati metodi di classificazione molecolare 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 di un microrganismo (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.

2.1.1.1 Tecniche fenotipiche di caratterizzazione

Si basano sulla valutazione di proprietà fenotipiche come la morfologia cellulare e di colonia, della crescita su diversi substrati e della 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 di cocco, di bastoncino oppure la produzione di aggregati cellulari sotto forma di coppie, tetradi o catenelle. Anche la colorazione di Gram è di grande importanza per la caratterizzazione dei

microrganismi, fornendo 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. Altri criteri vengono poi utilizzati nel caso in cui la caratterizzazione abbia lo scopo di selezionare colture standard per innescare una 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).

2.1.1.2 *Tecniche genotipiche*

Anche i metodi di identificazione genotipici, che si basano sull'analisi del DNA, e permettono di distinguere microrganismi appartenenti a specie diverse (caratterizzazione a livello di specie) oppure di analizzare la variabilità intraspecifica dei ceppi appartenenti a una stessa specie o popolazione (tipizzazione a livello di ceppo).

In particolare molti di questi sistemi di identificazione si basano sull'analisi dell'DNA ribosomale 16S che è stato dimostrato essere uno strumento tassonomico di fondamentale importanza nella 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.

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 (Ventura *et al.*, 2000; 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).

Rybotyping

Questa tecnica prevede un primo passaggio di restrizione enzimatica generalmente con l'enzima *EcoRI*, del DNA estratto da colture cellulari successivamente avviene la separazione elettroforetica dei frammenti ottenuti e infine si procede

alla loro ibridazione con sonde che hanno come target i geni ribosomali (Southern blot). La scelta della sonda è di fondamentale importanza perché da essa dipende la risoluzione del sistema: l'utilizzo di sonde universali (come quelle costruite per i geni ribosomali) permette la identificazione delle specie mentre l'utilizzo di altre sonde può consentire la discriminazione a livello di ceppo (Mohania *et al.*, 2008). Anche questa tecnica è stata utilizzata con successo per l'identificazione di specie di batteri lattici enologici (Rodas *et al.*, 2005) per il suo alto potere di discriminativo, presenta però lo svantaggio di necessitare di colture pure per l'analisi e presenta una certa complessità di esecuzione soprattutto nel passaggio di Southern blot.

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.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Questo metodo si basa sull'amplificazione selettiva dei frammenti ottenuti dalla restrizione totale del DNA genomico, tramite primer nella cui sequenza è compreso un tratto complementare a quella di frammenti "adattatori" che aggiunti alla miscela di restrizione si legano al sito riconosciuto dagli enzimi utilizzati nell'analisi (Ben Amor *et al.*, 2007). Questa tecnica è stata sviluppata

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.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

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 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 (Zapparoli *et al.*, 2001; 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

appartenenti al *L.plantarum* group che non sono distinguibili con altre tecniche come ad esempio la ARDRA.

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; Mohapatra *et al.*, 2007).

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 (Kostinek *et al.*, 2005), 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 (Mohapatra *et al.*, 2007), di *Salmonella enterica* (Rasschaert *et al.*, 2005), di *L. plantarum* e *Pediococcus* sp. isolati dalla fermentazione dei semi di cacao in Nigeria (Kostinek *et al.*, 2008).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

La DGGE si basa sulla separazione di molecole di DNA sfruttando le differenze di stabilità chimica e temperatura di melting dovute alle differenze nella sequenze

nucleotidica. Le diverse molecole di DNA vengono separate su gel di poliacrilamide in cui è presente un gradiente crescente di concentrazione di un agente in grado di denaturare il DNA (generalmente urea).

Una importante variante di questa tecnica è la PCR-DGGE che consiste nell'amplificazione del DNA e la successiva separazione dei frammenti ottenuti in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti. Gli ampliconi potranno essere della stessa lunghezza ma differendo nella sequenza, tipica di ciascuna specie, potranno essere separati nel gel, generando un fingerprinting specie specifico.

I primers utilizzati in PCR-DGGE possono amplificare regioni di DNA molto variabili nella specie per una caratterizzazione ceppo-specifica oppure una regione altamente conservata per quella specie-specifica.

Per le sue caratteristiche specifiche, questa tecnica è in grado di rilevare anche microrganismi vitali ma non coltivabili su terreni di laboratorio, infatti la DGGE permette una caratterizzazione di popolazioni microbiche direttamente dall'ambiente, senza dover prima isolare i microrganismi, con una riduzione incredibile dei tempi di caratterizzazione. Un altro importante vantaggio è l'elevato grado di discriminazione in quanto è in grado di separare frammenti che differiscono anche per un solo paio di basi. Uno svantaggio da considerare è la bassa capacità di rilevazione delle specie a bassa frequenza nelle popolazioni naturali, che può portare una sottostima di alcuni microrganismi (Ben Amor *et al.*, 2007).

Questa tecnica viene diffusamente utilizzata per lo studio di popolazioni naturali batteriche, alcuni esempi sono la caratterizzazione dell'ecosistema della bacca dell'uva (Renouf *et al.*, 2005; Bae *et al.*, 2005) e lo studio delle dinamiche di popolazione di *O.oeni* e *L.plantarum* in vino durante la fermentazione malolattica (Spano *et al.*, 2007).

In alcuni casi la DGGE si è rivelata un utile metodica per la caratterizzazione a livello di ceppo come per ceppi di *L.plantarum* (Spano *et al.*, 2006), ma la complessità di esecuzione e la difficile messa a punto del protocollo ne fanno sicuramente una tecnica meno utilizzabile rispetto alle altre finora descritte.

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 microrganismo 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).

2.2. MATERIALI E METODI

2.2.1. Ceppi batterici

Per la messa a punto dei metodi di monitoraggio sono stati utilizzati i seguenti ceppi di collezione e commerciali:

SPECIE	COLLEZIONE	NUMERO
<i>Oenococcus oeni</i> ALFA	<i>Lallemand</i>	ceppo commerciale
<i>O.oeni</i> MLV1D	<i>Bioagro</i>	ceppo commerciale
<i>O.oeni</i>	DSMZ	DSM 20252
<i>Oenococcus kitharae</i>	DSMZ	DSM 17330
<i>Weissella viridescens</i>	DSMZ	DSM 20410
<i>Weissella paramesenteroides</i>	DSMZ	DSM 20288
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	DSMZ	DSM 20343
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	DSMZ	DSM 20346
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicus</i>	DSMZ	DSM 20484
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	DSMZ	DSM 20176
<i>L.nageli</i>	DSMZ	DSM 13675
<i>L.plantarum</i>	DSMZ	DSM 20174
<i>L.casei</i>	DSMZ	DSM 20011
<i>L.brevis</i>	DSMZ	DSM 20054
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSMZ	DSM 20331
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>oxydans</i>	DSMZ	DSM 3503
<i>Acetobacter aceti</i>	DSMZ	DSM 2002

TAB. 2.1 Elenco dei ceppi di riferimento usati per la messa a punto della tecnica ARDRA
DSMZ= Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen

2.2.2. Ceppo utilizzato per l'inoculo della vinaccia

E' stato utilizzato ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae* FR95

Utilizzato nel preparato "Blastosel FR95" (Perdomini Spa).

Le caratteristiche commerciali sono riportate nella tabella seguente:

	BLASTOSEL FR95
Specie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Regione di provenienza	Valle della Loira (Francia)
Caratteristiche tecnologiche	o Temperatura ottimale: 12-30 °C (elevata predisposizione a fermentare a basse temperature, tra 16 e 20 °C)

	<ul style="list-style-type: none"> o Potere alcoligeno: 15° o Resa di fermentazione: 16,5 g di zucchero 1° alcool o Resistenza alla SO₂: molto elevata o Produzione di SO₂: molto bassa o Produzione di acidità volatile: molto bassa o Produzione di H₂S: trascurabile
Effetti sulla composizione del vino	Bassa produzione di acidità volatile, buona produzione di esteri etilici (ceppo aromatico)
Effetti organolettici	Nota aromatica molto intensa a carattere prevalentemente fruttato
Settori di applicazione	Vini bianchi freschi da consumarsi giovani, vini frizzanti, vini rossi
Standard qualitativi: popolazione vivente	>20 miliardi per grammo

2.2.3. Mezzi colturali

Per l'isolamento dei ceppi batterici da vinaccia è stato usato il mezzo di coltura Plate Count Agar (PCA) mentre per il mantenimento delle colture sono stati utilizzati i mezzi di coltura e le condizioni seguenti:

- batteri acetici, mezzo di coltura YPM (yeast peptone mannose) con incubazione a 30°C in aerobiosi e in agitazione per facilitarne l'ossigenazione;
- batteri lattici, terreno di coltura MRS a pH6,2 e incubazione a 30°C in condizioni di aerobiosi;
- *Oenococcus oeni*, mezzo di coltura Tomato Juice Broth a base di succo di pomodoro a pH4,8 e incubazione a 30°C in giare contenenti un kit per anaerobiosi (Anaerogen OXOID).

Viene qui di seguito elencata la composizione dei mezzi di coltura utilizzati, dove non espressamente indicato, tutti i reagenti sono forniti dalla OXOID.

MRS

La composizione finale del mezzo MRS è la seguente: peptone 10g/l, estratto di carne 10g/l, estratto di lievito 5g/l, potassio fosfato biacido 2g/l, diammonio citrato 2g/l, glucosio 20g/l, Tween80 0,1%, sodio acetato 5g/l, magnesio solfato 0,58g/l, manganese solfato 0,28g/l.

E' stato utilizzato il mezzo già pronto con eventuale aggiunta di 15g/l di bacto agar , autoclavato a 121°C per 15 minuti.

TOMATO JUICE BROTH

E' stato utilizzato il mezzo Tomato Juice Broth (DIFCO) con la seguente composizione: succo di pomodoro 20g/l, estratto di lievito 10g/l, destrosio 10g/l, potassio fosfato biacido 0,5g/l, potassio monofosfato 0,5g/l, magnesio solfato 0,1g/l, cloruro di sodio 0,01g/l, solfato di ferro 0,01g/l, manganese solfato 0,01g/l.

Il mezzo è stato portato a pH 4,8 e dopo eventuale aggiunta di 15g/l di bacto agar, autoclavato a 121°C per 15 minuti.

PCA

La composizione finale del mezzo è: peptone 5g/l, estratto di lievito 2,5g/l, glucosio 1g/l.

E' stato utilizzato il mezzo già pronto PCA con eventuale aggiunta di 15g/l di bacto agar, autoclavato a 121°C per 15 minuti.

YPM

La composizione finale del mezzo è: peptone 3g/l, estratto di lievito 5g/l, D - mannitolo 25g/l.

Il mezzo è stato autoclavato a 121°C per 15 minuti dopo eventuale aggiunta di 15g/l di bacto agar .

2.2.4. Campionamento di vinacce

E' stata utilizzata uva di Prosecco raccolta durante la vendemmia 2007, proveniente dalla zona di Fregona (Treviso). Dopo la pigiatura, la vinaccia separata dal mosto è stata immediatamente suddivisa in due parti da 4q.li ciascuna: una parte raffreddata mediante aggiunta di 10% in peso di pellet di CO₂ e l'altra mantenuta a temperatura ambiente. Dopo 8 ore le vinacce sono state trasferite in sacchi da 30kg ciascuno (tesi T0R e tesi T0NR). A questo punto 90kg della vinaccia non refrigerata sono stati acidificati con H₂SO₄ al 33% e trasferiti in sacchi di plastica da 30kg ciascuno. Infine un'aliquota da 150kg delle vinacce refrigerate e una di quelle non refrigerate è stata inoculata con una sospensione del lievito commerciale FR95. Questo materiale è stato suddiviso in sacchi da 30kg (tesi T0NRI e tesi T0RI). Tutti i sacchi sono stati mantenuti a temperatura ambiente per tutta la durata della prova sperimentale. I campionamenti sono stati effettuati dopo 8 ore dalla pigiatura (T0), dopo 30 giorni (T30), dopo 120 giorni (T120) e dopo 180 giorni di insilamento (T180).

2.2.5. Isolamento dei batteri da vinaccia

Per ogni campionamento sono stati prelevati 20g di vinaccia in differenti punti del sacco, quindi il materiale vegetale è stato risospeso in 200ml di PBS pH 7,4 (8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44g/l Na₂HPO₄, 0,24g/l KH₂PO₄). Dopo 10 minuti di agitazione si è proceduto alle diluizioni seriali necessarie per l'inoculo su piastre Petri. Per l'isolamento e la conta dei batteri, al terreno PCA è stato addizionato l'antifungino cicloesimide (SIGMA) alla concentrazione di 200µg/ml, per inibire lo sviluppo di muffe e lieviti. Per ogni diluizione sono state allestite cinque repliche per poter avere un valore affidabile dalla conta delle colonie. Le piastre sono state incubate a 26°C in condizioni di aerobiosi (PCP) o anaerobiosi (PCM) utilizzando apposite giare e un kit per anaerobiosi (Anaerogen OXOID).

Dopo un periodo di incubazione di 15 giorni si è proceduto alla conta delle colonie cresciute. Le conte sono state effettuate su piastre che avevano un numero di colonie comprese tra 30 e 300.

Per l'isolamento sono state prelevate 30 colonie per ogni tesi e per ogni terreno, e osservate al microscopio ottico per individuare le colonie batteriche e

distinguerle da quelle di lieviti. Solo le colonie identificate come batteri sono state sottoposte alle successive analisi.

Gli isolati batterici sono stati stoccati in una soluzione di glicerolo solfato (Glicerolo 80 %, MgSO₄ 20 mM) e skim milk 10 % e conservati a -80°C.

2.2.6. Caratterizzazione molecolare mediante 16S-ARDRA

2.2.6.1 Lisi cellulare

Una singola colonia è stata risospesa in 50µl di soluzione di lisi (SDS 0,25% e NaOH 0,05M), poi è stata sottoposta ad agitazione tramite vortex per 60 secondi. La sospensione cellulare è stata incubata nel termociclatore a 95° C per 15 minuti e quindi centrifugata per 10 minuti a 15000 rpm. Questa procedura di lisi ha avuto lo scopo di distruggere la membrana cellulare e rilasciare gli acidi nucleici in soluzione.

2.2.6.2 Amplificazione del DNA

E' stato amplificato un tratto di rDNA 16S utilizzando i primers universali PA e PH (Rodas *et al*, 2003):

PA: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'

PH: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3'

La composizione della miscela di reazione è la seguente: 200µM dNTPs (Invitrogen) , 1µM Primers (MWG Biotech) , 1U TAQ polimerasi (Amersham), 2µl DNA (lisato), il volume totale della miscela è stato di 25µl.

Il protocollo termico utilizzato è stato il seguente:

Step1 (1X) 94°C per 5'

Step2 (35X) 94°C per 30'' - 56°C per 30'' - 72°C per 1'

Step3 (1X) 72°C per 5'

Il primo ciclo a 94°C per 5' consente la lisi delle cellule e il rilascio del DNA in soluzione.

Gli amplificati sono stati conservati a 4°C per le successive analisi.

2.2.6.3 Elettroforesi dei prodotti di PCR

Il controllo dell'amplificato è stato effettuato su gel di agarosio all'1,2% contenente 0.1µg/ml di etidio bromuro per la visualizzazione del DNA all'ultravioletto.

La corsa elettroforetica è avvenuta a 80V per 30 minuti in un buffer TBE (44.5mM Tris, 44.5mM acido borico, 1mM EDTA) con l'ausilio dell'apparato elettroforetico orizzontale Sub-cell GT (Biorad). I gel sono stati visualizzati con il transilluminatore alla lunghezza d'onda di 312nm e sono stati fotografati con fotocamera digitale. L'immagine è stata analizzata con il programma Kodak 1D (versione 3.6).

2.2.6.4 Restrizione del DNA

L'amplificato è stato digerito con 5U dell'enzima *Tru1I* (Fermentas) in un volume totale di 20µl e incubato a 65°C per 2 ore. A seconda dell'intensità della banda apparsa nel gel di agarosio abbiamo utilizzato dagli 8 ai 12µl di amplificato per la reazione di restrizione.

2.2.6.5 Elettroforesi dei prodotti della digestione enzimatica

Il DNA digerito è stato caricato su gel di agarosio al 2% contenente 0.1µg/ml di etidio bromuro e la corsa elettroforetica è avvenuta a 120V, per 3,5 ore in un buffer TBE. I gel sono stati visualizzati con il transilluminatore alla lunghezza d'onda di 312nm e sono stati fotografati con fotocamera digitale. L'immagine è stata analizzata con il programma Kodak 1D (versione 3.6).

2.2.6.6 Sequenziamento del DNA

I prodotti di PCR sono stati purificati per via enzimatica con il kit EXO-SAP (USB) seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

Il prodotto purificato è stato quantificato su gel d'agarosio, mescolato con il primer PA e dopo opportuna essiccazione sotto vuoto sono stati inviati per il sequenziamento alla ditta BMR genomics (Padova).

2.2.7. Caratterizzazione molecolare mediante rep-PCR

2.2.7.1 Estrazione del DNA

Nel caso *L. plantarum* sono stati considerati 2 ml di coltura liquida in fase stazionaria mentre per *O. oeni* è stata utilizzati 14ml di coltura cresciuta in provette tipo Falcon da 15ml. In entrambi i casi è stato raccolto un pellet di cellule tramite centrifugazione a 14000 rpm per 5 minuti.

Il pellet di cellule è stato risospeso in 88µl di TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,40) e alla sospensione cellulare sono stati aggiunti 10µl di una soluzione di lisozima 25mg/ml e 2 µl di mutanolisina alla concentrazione stock di 500 U/ml. Le cellule così trattate sono state incubate in bagnetto termostato a 37°C per 90' per facilitare la lisi cellulare. Il campione è stato successivamente centrifugato a 10000 rpm per 10' e il pellet ottenuto è stato risospeso in 500µl di TE (Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 7,40), con l'aggiunta di 50µl di SDS (Sodio Dodecilsolfato) al 10%. La miscela è stata incubata a 65°C per 30' poi in ghiaccio per 30' con l'aggiunta di 200µl di potassio acetato 5M per la precipitazione dei lipidi. Il DNA recuperato dal surnatante dopo centrifugazione a 14000rpm per 10' è stato precipitato mediante l'aggiunta di 500µl di isopropanolo freddo, e successiva centrifugazione a 14000rpm per 10'. Infine dopo un passaggio di lavaggio con etanolo al 70%, il DNA è stato seccato mediante l'utilizzo di evaporatore sottovuoto e quindi risospeso in H₂O deionizzata sterile e trattato con 1,5 µl di RNasi 10 mg/ml per 30' a 37°C per eliminare la contaminazione da RNA.

2.2.7.2 Elettroforesi e quantificazione del DNA estratto

Per la quantificazione del DNA estratto è stata condotta una separazione elettroforetica su gel contenente 0,5 % di agarosio e 0,1 µg/ml di etidio bromuro, in tampone TBE 0,5x e l'ausilio dell'apparato elettroforetico orizzontale Sub-cell GT (Biorad). I gel sono stati visualizzati con il transilluminatore alla lunghezza d'onda di 312nm e sono stati fotografati con fotocamera digitale. L'immagine è stata analizzata con il programma Kodak 1D (versione 3.6).

Nel gel sono stati caricati anche tre campioni contenenti DNA totale del fago *lambda* alle concentrazioni rispettivamente di 50, 100, e 200ng/ml, per la costruzione della retta di taratura per la quantificazione del DNA estratto presente sulle altre corsie del gel. La costruzione della retta di taratura e la determinazione

della concentrazione del DNA del campione sono state ottenute mediante l'utilizzo del programma Kodak 1D (versione 3.6).

2.2.7.3 Amplificazione del DNA

Nel caso della caratterizzazione a livello di ceppo mediante rep-PCR è stato utilizzato il primer (GTG)₅ (Versalovic *et al.*, 1994) la cui sequenza è: 5'-GTGGTGGTGGTGGTG - 3'

Le prove preliminari per la scelta del sistema di caratterizzazione ceppo specifico hanno richiesto l'utilizzo dei seguenti primer:

BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), tratti da Versalovic *et al.*, 1994; la coppia di primer OUTBOND ISRH1outR22 (5' – CGCTGACAACGT GACATCACCG-3') e ISRH1outF22 (5' – ATCAAACAACGT GACATCGCCG-3') tratti da Muresu *et al.*, 2005.

La composizione della miscela di reazione è stata la seguente: 200 µM dNTPs (Invitrogen), 2 µM primer (BMW Biotech), 0,5U Taq polimerasi (GoTaq, Promega), 100ng DNA. Il volume totale della miscela è stato di 25µl.

Il protocollo termico di amplificazione utilizzato è stato il seguente:

Step1 (1X) 95°C per 3'

Step2 (35X) 95°C per 30'' - 52°C per 60'' - 72°C per 4'

Step3 (1X) 72°C per 5'

2.2.7.4 Elettroforesi dei frammenti di amplificazione

L'elettroforesi dei frammenti di amplificazione è stata condotta su gel all'1,5% di agarosio, con 0,1 µg/ml di etidio bromuro a 120 V per 4,5h. Il marker di peso molecolare usato è stato una miscela al 50 % di due marker molecolari 1 Kbp + 100 bp, (Fermentas). I gel sono stati visualizzati con il transilluminatore alla lunghezza d'onda di 312nm e sono stati fotografati con fotocamera digitale. L'immagine è stata analizzata con il programma Kodak 1D (versione 3.6).

2.3. RISULTATI E DISCUSSIONE

2.3.1. Allestimento della prova sperimentale

La prova sperimentale è stata allestita con lo scopo di caratterizzare la microflora batterica tipica della vinaccia di Prosecco destinata alla produzione di grappa, oltre che per valutare l'effetto di alcuni trattamenti tecnologici sulla microflora presente nelle vinacce vergini. Attualmente sono molto scarse le informazioni in merito alla componente batterica presente in vinaccia, infatti l'unico studio pubblicato sull'argomento è quello di De Pina e Hogg (1999) dove la vinaccia di una varietà d'uva bianca del Portogallo, viene caratterizzata durante tutto l'insilamento del materiale vegetale. Nello studio di De Pina e Hogg si osserva una elevata carica microbica già all'inizio della sperimentazione, con circa 10^7 CFU/g di batteri lattici e dopo 3 settimane di insilamento la carica microbica riferita ai batteri lattici aumenta fino ad arrivare al valore di 10^9 CFU/g. Inoltre sono state rilevate notevoli alterazioni chimiche durante le prime 3 settimane di insilamento, periodo nel quale i batteri lattici dominano la microflora. In particolare le concentrazioni di l'acido tartarico e malico diminuiscono e l'acido lattico aumenta, indice di un'intensa attività metabolica batterica (De Pina e Hogg, 1999).

Da questi scarsi dati di letteratura, risulta comunque rilevante la componente batterica a livello quantitativo per tutta la durata dell'insilamento, quindi la componente batterica probabilmente avrà un ruolo importante nella microflora della vinaccia e anche nella qualità del prodotto finito.

Durante lo stoccaggio della vinaccia avvengono molte reazioni biochimiche oltre alla fermentazione alcolica degli zuccheri da parte dei lieviti, si tratta di processi metabolici condotti anche da specie di batteri e che possono influenzare la qualità della grappa soprattutto per la produzione di composti aromatici. E' opinione comune che i batteri svolgano un ruolo importante in questi processi e spesso essi sono associati alla produzione di composti volatili sgradevoli detti "*off-flavour*" anche se a tutt'oggi non esistono dati scientifici che dimostrano il ruolo della componente batterica in vinaccia italiana.

In questa sperimentazione, quindi, sono stati presi in considerazione anche alcuni trattamenti tecnologici che vengono spesso effettuati in distilleria per controllare lo sviluppo della microflora durante l'insilamento della vinaccia.

In particolare è stata considerata la refrigerazione della massa vegetale durante il trasporto dalla cantina alla distilleria allo scopo di impedire la proliferazione della microflora residente durante la fase di trasporto. Questo trattamento in realtà non è molto diffuso tra i produttori, sono state condotte solo poche sperimentazioni effettuate da alcune aziende con la rilevazione dei principali parametri di qualità del prodotto ottenuto dopo questo trattamento. In questa sperimentazione la refrigerazione (condotta per 8 ore alla temperatura di 16-17°C) è stata ottenuta mescolando alla vinaccia, ancora in cantina, una opportuna quantità CO₂ in pellet. In distilleria una parte della vinaccia refrigerata e il suo controllo non refrigerato sono stati sottoposti ad un altro trattamento tecnologico: l'acidificazione, ottenuta mediante l'aggiunta di acido solforico che ha permesso di abbassare il pH fino ad un valore 3,5. Questo tipo di trattamento è molto diffuso tra le distillerie soprattutto quando la conservazione delle vinacce è protratta per tempi lunghi. In realtà l'acidificazione viene condotta senza una opportuna valutazione degli aspetti microbiologici, ma unicamente considerando i composti aromatici prodotti. Infine è stata saggiata la possibilità di utilizzare un ceppo selezionato di lievito per condurre la fermentazione alcolica. L'inoculo di lieviti selezionati è una pratica totalmente sconosciuta nel settore di produzione della grappa, nonostante sia utilizzata routinariamente nella vinificazione. Una porzione della vinaccia sottoposta a refrigerazione e il suo controllo non refrigerato, quindi, sono stati inoculati con un lievito selezionato commerciale. E' stato scelto ceppo commerciale di *Saccharomyces cerevisiae* FR95 Utilizzato nel preparato "Blastosel FR95" (Perdomini Spa), utilizzato spesso in vinificazione, con una forte connotazione tecnologica molto e apporto aromatico molto limitato. Successivamente le vinacce sono state insilate in sacchi di plastica e la conservazione a temperatura ambiente è stata protratta per 6 mesi, durante i quali sono avvenuti i campionamenti delle porzioni di vinaccia da sottoporre ad analisi chimiche, microbiologiche e genetiche, seguendo lo schema in figura 2.1.

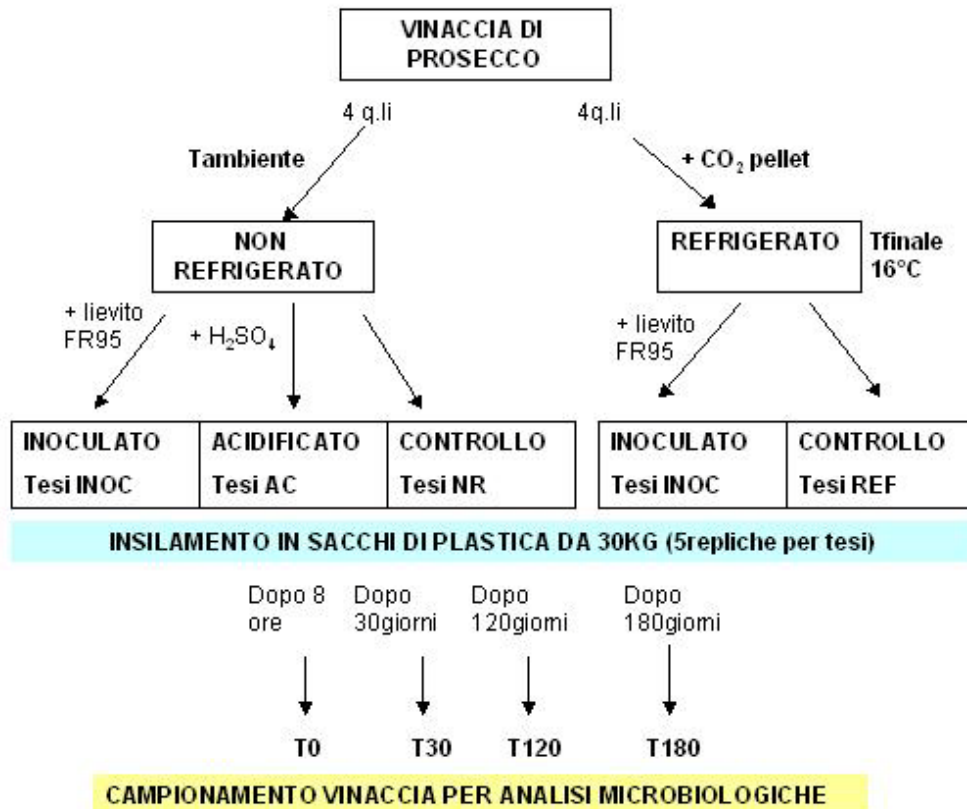


FIG 2.1 Schema della sperimentazione condotta in vinaccia di Prosecco, con illustrazione dei trattamenti tecnologici effettuati. Sono indicate le tesi analizzate e i tempi dei campionamenti di vinaccia.

Nel grafico seguente vengono riportati i dati dell'andamento del pH misurato in vinaccia durante l'insilamento, vengono confrontati i valori di pH misurato nella vinaccia non trattata e nella vinaccia acidificata. Il trattamento di acidificazione ottenuto attraverso l'aggiunta di H_2SO_4 ha portato effettivamente alla riduzione del pH della massa vegetale: infatti nella vinaccia all'inizio della sperimentazione (T0) il pH è sceso da un valore di circa 3,8 a 3,5 nella tesi acidificata. Questa differenza di pH tra le due tesi si è mantenuta per tutto il tempo dell'insilamento, anche se dopo 30 giorni di stoccaggio della vinaccia il pH è aumentato in entrambe le tesi arrivando a 4 nel controllo no trattato e 3,8 circa nella tesi acidificata. Possiamo quindi osservare che il trattamento di acidificazione è risultato efficace perché pur non avendo portato a una drastica riduzione del pH, ha però consentito di mantenere una differenza di pH costante tra le due tesi analizzate.

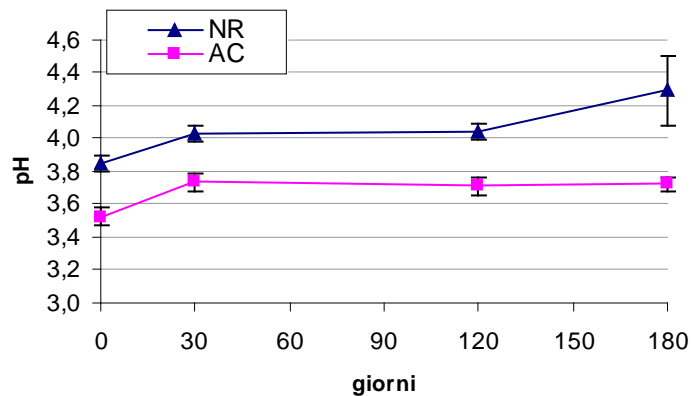


FIG 2.2 Andamento del pH nella vinaccia utilizzata nella sperimentazione al momento dell'insilamento e dopo 30, 120 e 180 giorni.

NR, vinaccia non refrigerata; AC, vinaccia non refrigerata acidificata.

2.3.2. Analisi quantitativa della popolazione batterica

Per determinare la carica microbica in vinaccia nel corso dell'insilamento è stato scelto il terreno di crescita PCA (Plate Count Agar) che generalmente viene utilizzato per la determinazione della microflora totale. Questo mezzo di coltura permette lo sviluppo della maggior parte dei microrganismi e risulta il più idoneo all'analisi di una microflora ignota, come nel caso della vinaccia. Prima di procedere con l'isolamento delle colonie dalle piastre sono state effettuate delle osservazioni al microscopio ottico in modo da accertarsi della natura del microrganismo isolato, è infatti possibile determinare se si tratta di batterio o di un lievito grazie alla differenza di dimensione cellulare.

Dai campioni di vinaccia prelevati durante l'insilamento, sono state preparate delle sospensioni in un apposito tampone salino e dopo opportune diluizioni, i campioni sono stati piastrati nel terreno PCA in doppio: per ciascun campione una serie di piastre è stata incubata in condizioni aerobiche per isolare i batteri aerobi come ad esempio i batteri acetici, un'altra serie di piastre sono state incubate in condizioni di microaerofilia in presenza di elevate concentrazioni di CO₂ per isolare batteri anaerobi o arotolleranti come la maggior parte dei batteri lattici.

Nelle figure seguenti sono riportati il numero di batteri coltivabili per grammo di vinaccia determinato in tutte le vinacce analizzate dall'inizio dello stoccaggio per tutta la sua durata, in condizioni aerobiche (PCP) e in condizioni microaerofile (PCM).

All'inizio della sperimentazione (figura 2.3), la popolazione batterica determinata su PCP è decisamente più numerosa rispetto a quella ottenuta incubando le piastre in PCM ($2,5 \times 10^6$ CFU/g contro $4,6 \times 10^5$ CFU/g). La popolazione che si sviluppa nella vinaccia appena separata dal mosto infatti è quella originariamente presente sulla superficie del grappolo alla vendemmia: si tratta quindi di una microflora prevalentemente di tipo aerobio. La refrigerazione invece, non sembra avere influenzato molto la crescita batterica infatti non ci sono differenze significative ($p > 0,05$) nelle determinazioni ottenute in presenza o assenza di refrigerazione.

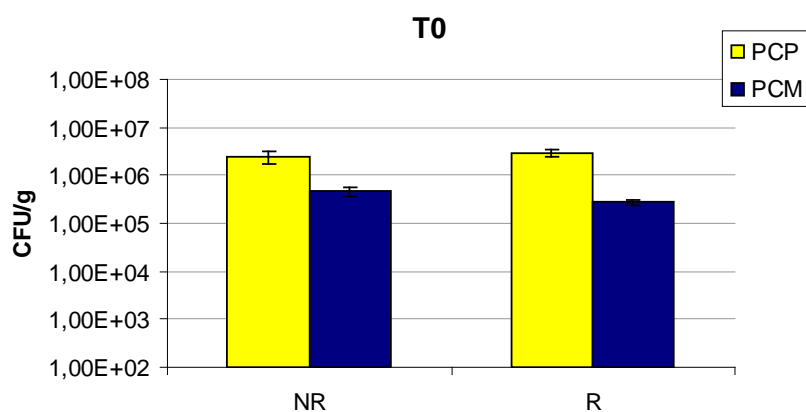


FIG. 2.3 Quantificazione della popolazione batterica mediante crescita su terreno PCA in anaerobiosi (PCM) e in condizione di microaerofilia (PCP) isolata all'inizio dello stoccaggio (T0)

In figura 2.4 sono riportati i dati relativi alle conte batteriche ottenute analizzando le vinacce ai diversi tempi di campionamento: 30, 120 e 180 giorni.

Per confronto sono riportate in figura 2.5 le concentrazioni della popolazione di lievito presente nelle vinacce vinaccia durante tutto l'insilamento. Queste determinazioni sono state effettuate sulle stesse porzioni di vinaccia prelevate per l'analisi batterica, per l'isolamento dei lieviti è stato utilizzato il mezzo di coltura YM e condizioni di aerobiosi. È stato effettuato un campionamento aggiuntivo rispetto a quelli per l'analisi della popolazione batterica, e cioè anche a 15 giorni per monitorare l'andamento dei lieviti nelle prime fasi dell'insilamento quando si prevede una maggiore rilevanza di questa componente.

In tutti i grafici sono state utilizzate delle sigle per distinguere le vinacce che hanno subito i diversi trattamenti analizzate: NR=non refrigerata; R=refrigerata; AC=acidificata; INOC=inoculata con ceppo di lievito commerciale; CTR=controllo non trattato.

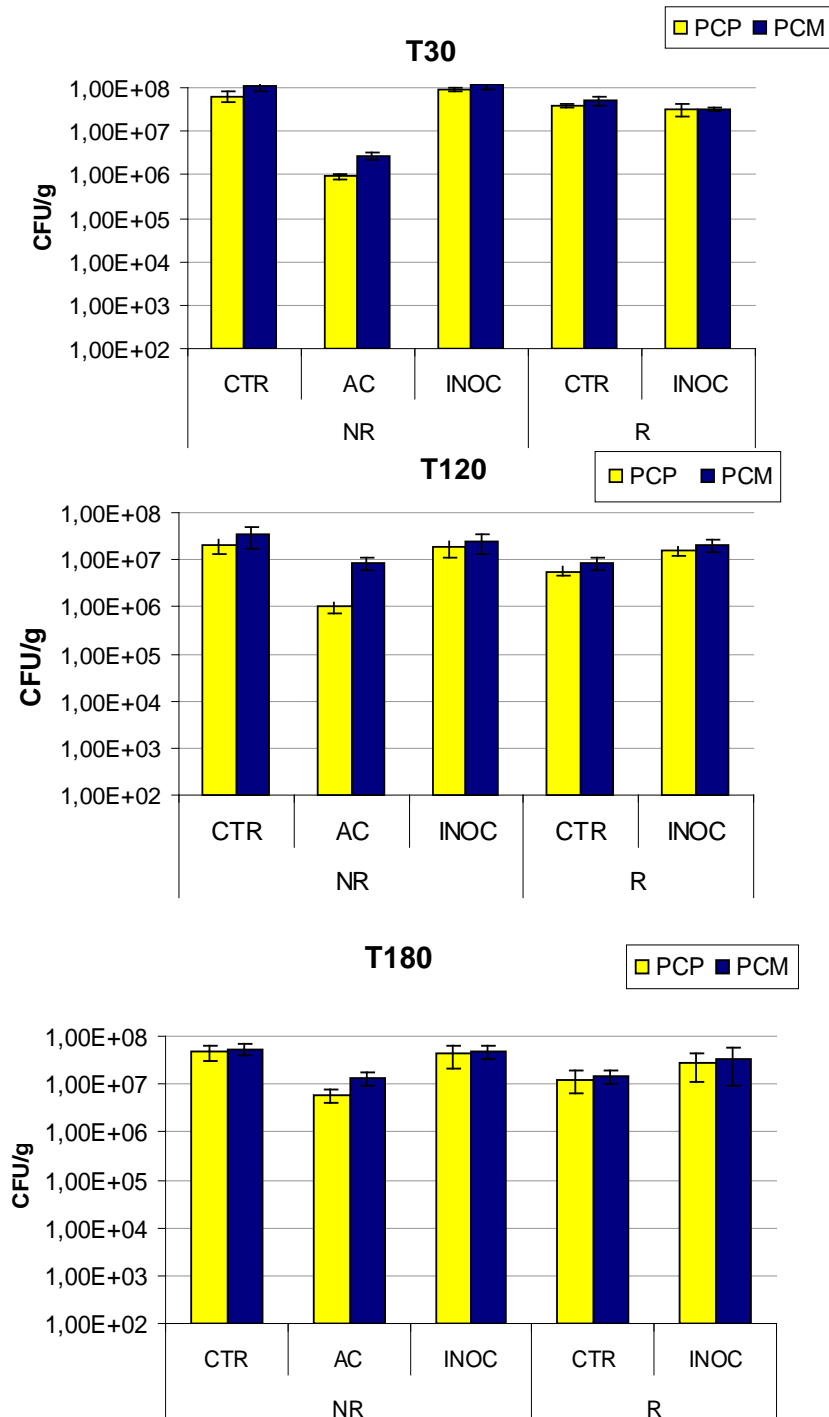


FIG. 2.4 Quantificazione della popolazione batterica mediante crescita su terreno PCA in microaerofilia (PCM) e in condizione di aerobiosi (PCP) isolata a 30, 120 e 180 giorni di insilamento della vinaccia.

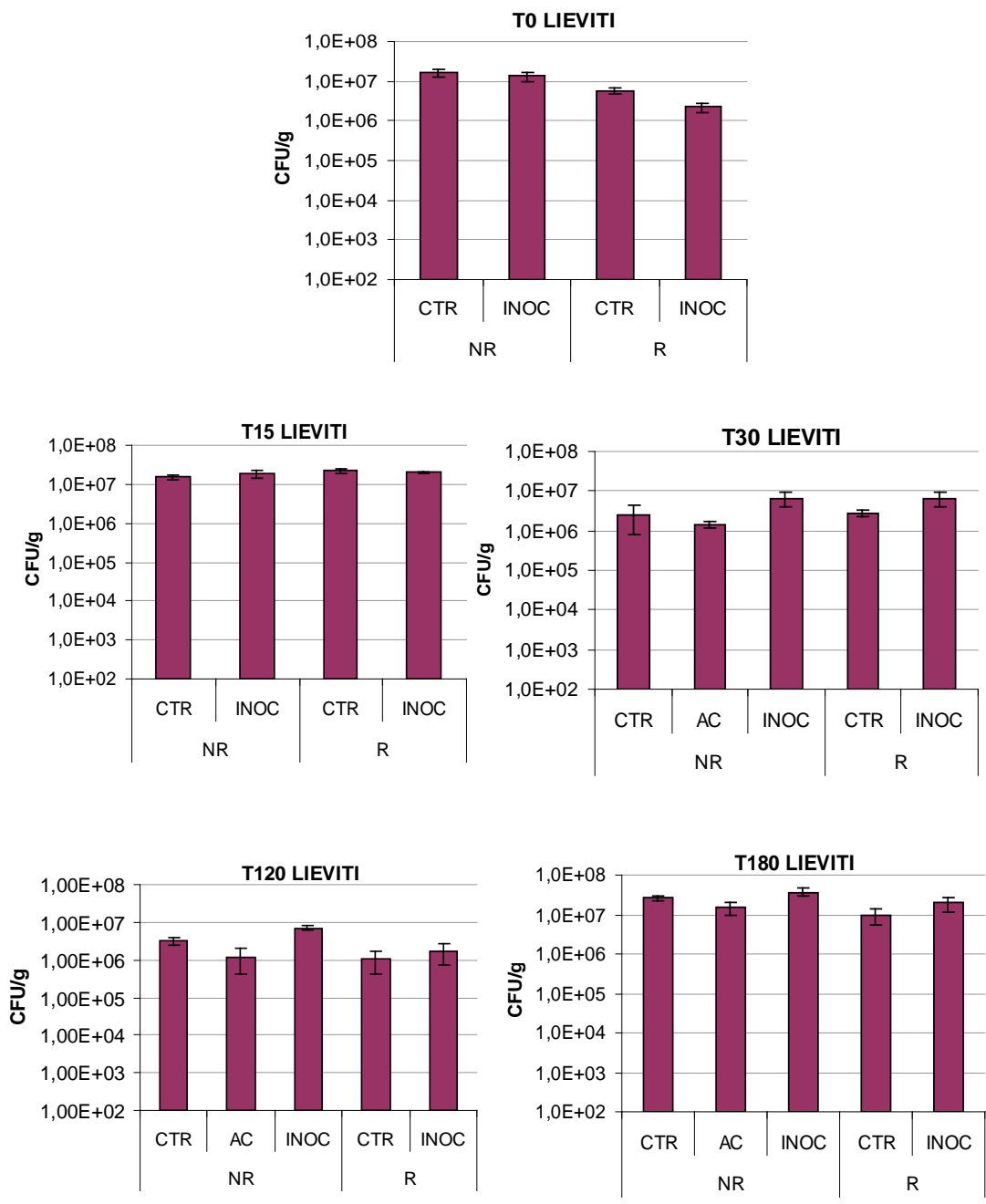


FIG. 2.5 Quantificazione della popolazione di lieviti mediante crescita su terreno YM a 0,15,30, 120 e 180 giorni di insilamento della vinaccia.

Nel campionamento a 30 giorni si può osservare un notevole aumento della carica microbica: la popolazione batterica sia aerobica che microaerofila è aumentata di circa 100 volte in tutte le tesi analizzate tranne in quella acidificata. Nonostante il pH sia stato abbassato solo di 0,3 unità con l'aggiunta di H₂SO₄ si osserva infatti un marcato effetto dell'acidificazione: a 30 giorni dall'insilamento la popolazione batterica delle vinacce acidificate è aumentata di sole 10 volte.

A 120 giorni dall'insilamento si osserva ancora l'effetto dell'acidificazione che ha ridotto notevolmente la crescita della popolazione batterica aerobia e microaerofila. Nel controllo non trattato e nelle vinacce refrigerate e refrigerate/inoculate invece la carica microbica si attesta rispettivamente attorno a valori di 5x10⁷ e 10⁷ CFU/g.

Nell'ultimo campionamento a 180 giorni si evidenzia un ulteriore appiattimento dell'effetto dell'acidificazione, anche se le differenze tra le concentrazioni delle popolazioni presenti in vinaccia acidificata e nel controllo non acidificato sono ancora significative (p<0,05).

Per quanto riguarda le popolazioni di lieviti si osserva innanzitutto, che durante il periodo monitorato, non esistono differenze sostanziali tra le vinacce che hanno subito i diversi trattamenti e il controllo non trattato. E' possibile affermare che né il trattamento di refrigerazione né l'acidificazione hanno determinato variazioni, rispetto al controllo, nella concentrazione delle popolazioni. All'inizio della sperimentazione i lieviti sono presenti in quantità elevate (circa 10⁷ CFU/g) per poi diminuire progressivamente di circa 10 volte dopo 30 e 120 giorni di insilamento. Alla fine del periodo esaminato si verifica un incremento della popolazione che ritorna a valori superiori a 10⁷ CFU/g.

E' stato osservato un parziale effetto di controllo della popolazione batterica nel caso refrigerazione e sorprendentemente nel caso in cui la refrigerazione sia stata combinata all'inoculo del ceppo di lievito commerciale. In quest'ultimo caso si verifica una evidente diminuzione della popolazione batterica all'inizio dell'insilamento, calo che poi tende a ridursi durante lo stoccaggio.

Nella vinaccia di prosecco si assiste quindi a una successione di microrganismi con i lieviti che dominano la microflora subito dopo la vendemmia e all'inizio dell'insilamento della vinaccia (superiori di circa 10 volte rispetto alla carica microbica dei batteri) per poi diminuire in quantità nelle fasi successive. A 30 e 120 giorni infatti è la componente batterica che prevale con una popolazione

superiore di 100 volte rispetto ai lieviti, mentre a 180 giorni di stoccaggio si ha un riequilibrio della situazione con lieviti e batteri presenti in quantità simili.

Questi dati trovano conferma nel già citato lavoro di De Pina e Hogg (1999). In questo studio la popolazione di batteri lattici dopo 3 settimane di insilamento della vinaccia raggiunge 10^9 CFU/g mentre i lieviti sono 100 volte meno numerosi (10^7 CFU/g).

Dall'analisi quantitativa della popolazione microbica si può quindi concludere che l'acidificazione della vinaccia ha prodotto una sensibile inibizione della crescita batterica, effetto che non si è invece verificato in seguito a nessuno degli altri trattamenti tecnologici.

Visti i risultati in termini quantitativi dell'acidificazione, è stato deciso di analizzare più approfonditamente la popolazione batterica per capire se il trattamento abbia avuto un effetto anche a livello qualitativo. Si è quindi scelto di studiare la composizione della microflora batterica nelle vinacce acidificate e non trattate, identificando le specie presenti ai diversi tempi di campionamento. In particolare si è scelto di analizzare i campioni raccolti all'inizio dello stoccaggio (T0), a 30 giorni e a 120 giorni di insilamento per studiare le dinamiche della diversa popolazione batterica durante l'insilamento della vinaccia.

2.3.3. Scelta del sistema di analisi per la caratterizzazione a livello di specie

Per la caratterizzazione della popolazione batterica in vinaccia è stata scelta la tecnica 16S-ARDRA perché è una delle metodiche più utili per l'identificazione delle specie presenti in un ambiente la cui microflora è poco conosciuta. Basandosi sull'utilizzo di primer universali per l'amplificazione di una porzione del 16S rDNA infatti, permette virtualmente l'amplificazione di tutte le specie batteriche. Inoltre l'amplificazione del gene ribosomale permette di avere del materiale da poter utilizzare per altre approfondite analisi come il sequenziamento. Un vantaggio che è risultato fondamentale per questo lavoro è stato la possibilità di effettuare l'analisi ARDA direttamente a partire dalle colonie batteriche senza la preparazione di colture pure né l'estrazione del DNA.

Questo ha infatti notevolmente semplificato e velocizzato il lavoro e ha permesso l'analisi di un ampio numero di campioni.

La tecnica ARDRA è stata precedentemente sperimentata su isolati batterici provenienti da vino e mosto ed ha permesso di identificare un gran numero di batteri lattici semplicemente a partire dalle colonie cresciute sulle piastre di isolamento (Rodas *et al.*,2003). Nell'articolo di riferimento sono stati saggiati tre enzimi diversi. L'endonucleasi di restrizione *BfaI* permette di identificare la maggior parte dei batteri lattici fatta eccezione di alcune specie da cui si ottiene lo stesso profilo. Sono stati identificati tre casi di questo tipo, ottenendo profili ibridi sono stati ottenuti i seguenti gruppi costituiti ciascuno da un singolo profilo. *Lactobacillus. plantarum* e *L. pentosus*, costituiscono il gruppo I; *L.rhamnosus* e *L. paracasei subsp. paracasei* il gruppo II e *Pediococuss. acidilactici* e *P. pentosaceus* il gruppo III. L'enzima *MseI* invece mostra una maggiore discriminazione rispetto all'enzima *BfaI*, distingue le specie anche all'interno dei gruppi ibridi. E' stato saggiato infine anche l'enzima *AluI* in grado specificatamente di discriminare *L. plantarum* e *L. pentosus* caratterizzati da un profilo ibrido con *MseI*.

Per le elevate capacità discriminanti, nell'analisi degli isolati da vinaccia è stato scelto l'enzima *TruI* (isoschizomero dell'enzima *MseI*). Per la messa punto della tecnica ARDRA sono stati utilizzati alcuni ceppi tipo delle specie maggiormente presenti in mosto, insieme ad alcuni ceppi commerciali tra i più importanti in enologia. Per ciascuno di questi ceppi è stata effettuata un'analisi ARDRA in modo da creare una nostra piccola banca dati di riferimento della specie e generi più diffusi nel settore enologico e di più quelle strettamente correlate; i risultati sono riassunti in tabella 2.2.

specie	ALFA	MLV1D	OO	OK	WV	WP	LEUCM	LEUCC	LEUCD	LH	LN	LP	LC	LB	PD	GO
Profilo	644	665	657	432	434	602	430	430	436	451	545	484	486	484	413	543
	255	303	260	265	283	304	283	282	299	274	295	295	269	382	267	348
	213	282	218	222	255	283	250	248	27	211	272	272	206	267	238	137
	153	215	75	161	218	219	222	220	246	146	158	158	142	205	179	115
	69	147		152	151	151	151	148	218	133	145	145	120	147	142	75
		106		108			111	117	151	116	110	12	109	118	107	
		79		77			84	86			95	102	75	78	74	
										75	75					

TAB 2.2 Dimensioni in paia di basi dei frammenti che costituiscono i profili ARDRA delle specie di riferimento.

ALFA=*O.oeni* ceppo commerciale, MLV1D= *O.oeni* ceppo commerciale; OO=*O.oeni* DSM20252, OK=*O.kitharae* DSM 17330, WV=*W.viridescens* DSM 20410, WP=*W.paramesenteroides* DSM 20288, LEUCM=*Leuc.mesenteroides* subsp.*paramesenteroides* DSM 20343, LEUCC=*Leuc.mesenteroides* subsp.*cremoris* DSM 20346, LEUCM=*Leuc.mesenteroides* subsp.*dextranicum* DSM 20484, LH=*L.hilgardii* DSM 20176, LN=*L.nageli* DSM 13675, LP=*L.planatarum* DSM 20174, LC=*L.casei* DSM 20011, LB=*L.brevis* DSM 20054, PD=*P.damnosus* DSM 20331, GO=*G.oxydans* DSM 3503.

I frammenti ottenuti hanno dimensioni variabili da un minimo di 75bp a un massimo di circa 700bp. I profili presentano un minimo di 4 bande (*O. oeni*) fino a un massimo di 8 (*L. plantarum*). Ciascuna specie ha dato un profilo ben distinguibile dagli altri e soprattutto dalle specie strettamente correlate. E' il caso di *Leuconostoc mesenteroides* che si distingue bene dal genere *Weissella* da poco tempo separato dal primo. Le due specie saggiate appartenenti al nuovo genere *W. viridescens* e *W. paramesenteroides*, pur determinando profili caratterizzati dallo stesso numero di frammenti, possiedono il tratto a maggior peso molecolare di dimensioni notevolmente diverse in grado di rendere distinguibile le due specie. Nel primo caso è di circa 400bp e nel secondo di 600. più difficile è l'identificazione delle sottospecie nel caso infatti di *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *cremoris* i profili sono pressoché identici. Questa situazione è giustificata dal fatto che le differenze tra le due sottospecie sono sicuramente molto minori, dal punto di vista tassonomico, rispetto a quanto si osserva a livello di specie, tale situazione si riflette su un minor polimorfismo della sequenza 16S difficilmente rilevabile con l'utilizzo degli enzimi di restrizione. In relazione

invece ad *O. oeni* sebbene la specie strettamente correlata con *O. kitharae* presenti un profilo distinguibile dal precedente si osserva polimorfismo all'interno dei tre ceppi saggiati, due dei quali rientrano in preparati commerciali, appartenenti alla suddetta specie. In particolare esiste una certa corrispondenza con i primi tre frammenti a maggior peso molecolare che compongono i profili, mentre quelli di dimensioni inferiori sono diversi a seconda del ceppo. Questo risultato merita senza ombra di dubbio indagini ulteriori con lo scopo di valutare se il polimorfismo rilevato sia attribuibile ad una non usuale variabilità intra-specifica oppure a una errata collocazione tassonomica dei ceppi commerciali.

2.3.4. Caratterizzazione a livello di specie degli isolati raccolti da vinaccia non trattata

Il protocollo ARDRA messo a punto grazie all'utilizzo dei ceppi di riferimento è stato poi applicato ai seguenti isolati da vinaccia: per ciascun tempo di campionamento sono state isolate e amplificate almeno 30 colonie cresciute in aerobiosi e 30 in anaerobiosi, per la tesi non trattata (controllo) e quella acidificata. In tutto sono stati presi in considerazione 360 isolati, dei quali un totale di 335 sono stati inseriti nell'analisi ARDRA, gli altri sono stati scartati perché non hanno prodotto un amplificato o hanno prodotto un profilo non analizzabile. In tabella 2.3 sono indicati gli isolati che sono stati inseriti nell'analisi ARDRA.

TEMPO	TESI	TERRENO DI ISOLAMENTO	NUM. ISOLATI
T0	NR	PCP	30
		PCM	30
T30	NR	PCP	30
		PCM	32
T30	AC	PCP	43
		PCM	37
T120	NR	PCP	28
		PCM	32
T120	AC	PCP	36
		PCM	37
<i>TOTALE</i>			335

TAB 2.3 Numero di campioni analizzati per ciascuna tipologia di trattamento.

La reazione di amplificazione con i primers universali PA-PH ha prodotto un frammento di 1500bp. Gli amplificati sono stati sottoposti a digestione con l'enzima *MseI* e i frammenti ottenuti sono stati separati mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Nella figura 2.6 è mostrato un esempio di un gel di agarosio che illustra la separazione dei frammenti ottenuti con l'ARDRA. Le corrispondenti bande avevano dimensioni variabili da un minimo di 75bp a un massimo di circa 700bp. Ogni profilo presentava da un minimo di 4 bande a un massimo di 8.



FIG 2.6 Gel di agarosio dei frammenti ottenuti dall'analisi ARDRA di alcuni campioni. A,I,L,D= profili ; m=marcatore di peso molecolare

I profili ottenuti con l'analisi ARDRA sono stati raggruppati sulla base del numero di frammenti presenti e del loro peso molecolare, in questo modo sono stati individuati 11 profili diversi denominati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla Q. Con l'ausilio del software Gel Compare II sono stati confrontati i profili ottenuti con quelli dei ceppi di riferimento e in questo modo è stato possibile assegnare alcuni dei gruppi individuati a una specie (dendrogramma figura 2.7). Per tutti i profili, ad eccezione di Q ed E, è stato possibile attribuire una collocazione tassonomica: il profilo L è risultato identico a quello riferibile al gruppo *L. plantarum*, il profilo A a *L. hilgardii*, il profilo N a *G. oxydans* e il profilo I a *O. oeni*.

I profili O e R sono molto vicini a quello ottenuto da *E.coli*, è ipotizzabile perciò che rientrino nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*. I profili P e D appartengono ad un gruppo che comprende solo batteri acetici, quindi è molto probabile la loro

appartenenza a questo gruppo, tuttavia acetici non è possibile con questo tipo di analisi attribuirli a una specie precisa.

La stessa situazione è stata osservata per il profilo C che è risultato vicino a quello dei generi *Pediococcus* e *Leuconostoc*, e quindi la sua identificazione risulta incerta.

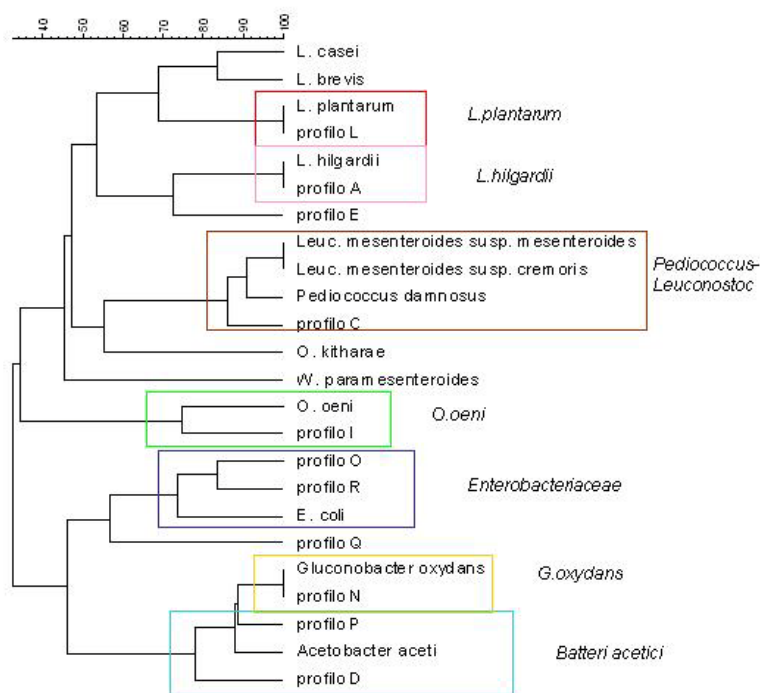


FIG 2.7 Dendrogramma ottenuto dall'analisi mediante GelComparII dei profili ARDRA ottenuti analizzando gli isolati da vinaccia e i ceppi enologici di riferimento .

Per confermare la specie di appartenenza e per identificare i gli isoalati rimasti ignoti, un rappresentante per ciascun gruppo è stato sottoposto al sequenziamento di una porzione del 16S rDNA. Le sequenze sono state analizzate grazie all'utility BLASTN che effettua il confronto della sequenza nucleotidica in esame con tutte quelle presenti nel database pubblico GenBank. In questo modo è stato attribuito all'isolato il nome della specie la cui sequenza, aveva il livello di similarità più alto.

In tabella 2.4 sono riassunti i risultati del sequenziamento con indicata la specie più vicina, la percentuale di similarità, l'identificativo assegnato al campione. In quasi tutti i casi in cui la percentuale di similarità ottenuta era maggiore del 98% è stato possibile assegnare il nome della specie.

PROFILO	SIMILARITA'	SPECIE DI RIFERIMENTO	ATTRIBUZIONE
L	99%	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ 20174	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A	99%	<i>Lactobacillus hilgardii</i> DSMZ 20176	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
E	99%	<i>L.paracollinoides</i> DSMZ 15502, <i>L.collinoides</i> DSMZ 20515	<i>Lactobacillus</i> sp.
I	99%	<i>Oenococcus oeni</i> DSMZ 20252	<i>Oenococcus oeni</i>
C	98%	<i>Pediococcus parvulus</i> DSMZ 20332	<i>Pediococcus parvulus</i>
D	99%	<i>A cetobacter syzygii</i> DSMZ 15548, <i>Acetobacter ghanaensis</i> DSMZ 18895	<i>Acetobacter</i> sp.
N	99%	<i>Gluconobacter oxydans</i> DSMZ 3503	<i>Gluconobacter oxydans</i>
P	98%	<i>Acetobacter cerevisiae</i> DSMZ 14362	<i>Acetobacter cerevisiae</i>
O	96%	<i>Tatumella ptyseos</i> DSMZ 5000	Enterobacteriacee
R	95%	<i>Kluyvera cochleae</i> DSMZ 4581	Enterobacteriacee
Q	95%	<i>H. Thermoluteolus</i> IFO14978	β proteobacterium

TAB. 2.4. Identificazione a livello di specie dei profili ottenuti con l'analisi ARDRA. E' indicata la percentuale di similarità ottenuta dal confronto della sequenza corrispondente a ciascun profilo con il database GenBank.

Per quanto riguarda le specie identificate appartenenti al gruppo dei batteri lattici (*L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. collinoides/paracollinoides*, *P. parvulus* e *O. oeni*) queste sono comunemente ritrovati in ambiente enologico, in particolare il gruppo *L. plantarum* e *L. hilgardii* i batteri lattici più frequenti nel mosto (Rodas *et al.*, 2003; Rodas *et al.*, 2005). Le specie *L. plantarum* e *L. collinoides* sono anche state individuate da de Pina and Hogg (1999) nel loro lavoro di caratterizzazione microbica delle vinacce, confermando l'importanza di questi gruppi microbici e soprattutto di *L. plantarum* in questa matrice vegetale.

Il gruppo identificato come *Lactobacillus* sp. risulta avere una sequenza con alta similarità con *L. collinoides* e *L. paracollinoides*, specie originariamente isolate rispettivamente dal succo di mela fermentato (Carr e Davies, 1972) e dalla birra (Suzuki *et al.*, 2004). Si tratta di due specie che sono difficilmente distinguibili anche dal punto di vista genetico, infatti possiedono un'omologia del 99% a livello del 16S DNA, la specie *L. paracollinoides* è stata separata da *L. collinoides* sulla base dell'ibridazione DNA-DNA e della diversa capacità di utilizzare il fruttosio (Suzuki *et al.*, 2004). *L. collinoides* è una specie tipica dell'ambiente enologico, dove è considerata contaminante a causa del suo attivo metabolismo di

degradazione del glicerolo e la conseguente produzione di acroleina che conferisce note di amaro al vino (Sauvageot *et al.*, 2000).

Tra i batteri acetici la specie *Gluconobacter oxydans* è comunemente isolata in vino, ma principalmente in mosto e nell'uva (Bartowsky e Henschke, 2008).

Acetobacter cerevisiae è una specie descritta per la prima volta nel 2002 ed è strettamente correlata alla specie *A. malorum* dalla quale era precedentemente indistinguibile (Cleenwerk *et al.*, 2002). Non è tra i batteri acetici prevalenti nel settore enologico. Infatti molto più spesso vengono isolati le specie *A. aceti* e *A. pastorianus* (Bartowsky e Henschke, 2008). *Acetobacter cerevisiae* è stato originariamente isolato nella birra ma si ritrova in altri vegetali fermentati come i semi di cacao (De Vuyst *et al.*, 2008) ed è stato anche individuato in molti vini cileni (Prieto *et al.*, 2007).

La tassonomia dei batteri acetici e del genere *Acetobacter* è molto controversa ed è attualmente in corso di revisione grazie all'utilizzo delle nuove tecniche di identificazione e classificazione molecolari come rep-PCR (Papalexandratou *et al.*, 2009). Infatti nuove specie di *Acetobacter* sono state recentemente descritte e alcune sono state isolate da vini per la prima volta, ad esempio *A. oeni* nei vini rossi portoghesi (Silva *et al.*, 2006) e *A. tropicalis* nei vini austriaci (Silhavy e Mandl, 2006). La sequenza 16S del rappresentante del gruppo identificato con il profilo D risulta molto simile a quella di due specie di *Acetobacter* (*A. syzygii* e *A. ghanaensis*) e pertanto non è stato possibile effettuare un'univoca attribuzione. La specie *A. syzygii* è stata originariamente isolata dal frutto della mela in Indonesia (Lisdianty *et al.*, 2002) e recentemente associata alla fermentazione del cacao dove è risultato essere la specie dominante (nel gruppo dei batteri acetici), insieme a *L. plantarum* (tra i batteri lattici) ed è quindi da considerare una specie comune nel materiale vegetale fermentato (Camu *et al.* 2007). *A. ghanaensis* è una specie proposta di recente originariamente isolata dai semi fermentati del cacao in Ghana da qui il suo nome (Cleenwerck *et al.*, 2007). Queste due specie sono molto vicine geneticamente infatti da uno studio basato sull'analisi della sequenza 16S rDNA, *A. syzygii* e *A. ghanaensis* hanno una similarità del 99,7% tra di loro e del 99,5% con *A. lovaniensis* (Cleenwerck *et al.*, 2007).

La specie *Tatumella ptyseos* (Hollis *et al.* 1981) è un membro della famiglia *Enterobacteriaceae*, viene normalmente isolata da campioni clinici. Si tratta di microrganismi Gram negativi, a metabolismo fermentativo.

La specie *Kluyvera cochleae* appartiene al genere *Kluyvera* che fa parte a sua volta della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. *K. cochleae* è stata recentemente identificata come sinonimo di *Enterobacter intermedius* e conseguentemente rinominata come *Kluyvera intermedia* (Izard *et al.* 1980) da Pavan *et al.* (2005). Si tratta di una specie isolata dall'acqua di superficie, dal suolo e da campioni di origine umana come il sangue. Per queste ultimi 2 microrganismi tuttavia la percentuale di similarità ottenuta non è sufficiente per una attribuzione certa quindi i due gruppi isolati da vinaccia verranno identificati in questo lavoro come appartenenti al gruppo *Enterobacteriaceae*. L'attribuzione comunque permette di dedurre che la loro presenza nella vinaccia è dovuta ad una contaminazione, probabilmente di derivazione dall'acqua di irrigazione del vigneto.

Hydrogenophilus thermoluteolus è un microrganismo strettamente aerobio, termofilo e appartiene alla classe dei β Proteobacteria ed è tipico dei terreni vicini alle sorgenti termali, originariamente indicato come *Pseudomonas thermoluteolus*, è stato successivamente descritto come nuova specie all'interno del nuovo genere *Hydrogenophilus* (Hayashi *et al.* 1999).

Verranno di seguito riportati i risultati relativi alla composizione e all'evoluzione della microflora batterica in vinaccia durante il suo insilamento (fig.2.8, 2.9, 2.10).

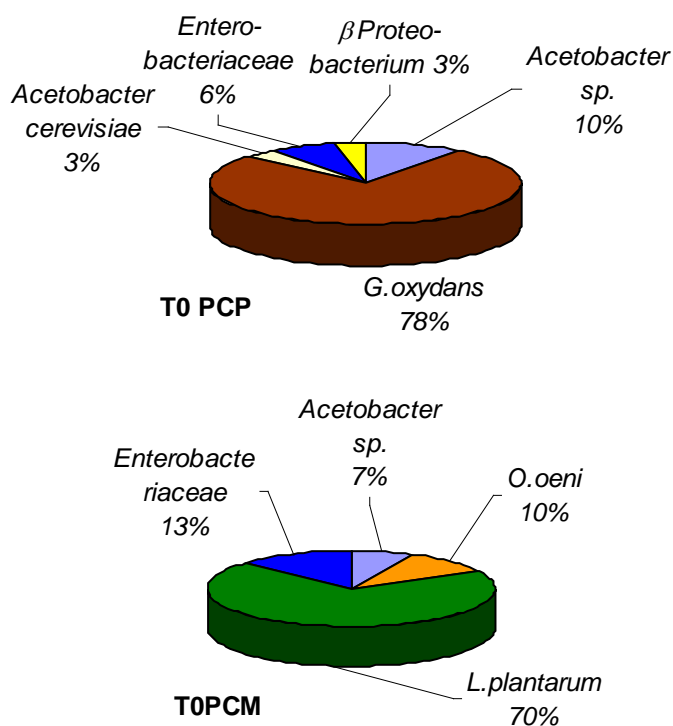


FIG.2.8 Composizione della popolazione batterica rilevata in aerobiosi (PCP) e anaerobiosi (PCM) all'inizio dello stoccaggio della vinaccia (tempo T0).

All'inizio dello stoccaggio sono stati isolati in condizioni microaerofile un'alta percentuale di batteri acetici e in minore percentuale *Enterobacteriaceae* e microrganismi appartenenti al gruppo dei β proteobatteri mentre in anaerobiosi è stato possibile isolare in prevalenza batteri lattici e una piccola percentuale di acetici e *Enterobacteriaceae*. *Acetobacter sp.* è stato ritrovato anche in condizioni microaerofile, evidentemente la quantità di ossigeno presente, se pure ridotta, ha permesso lo sviluppo di questo gruppo batterico. I batteri appartenenti al gruppo delle *Enterobacteriaceae* sono state trovate solo al tempo T0, possono essere considerati dei contaminanti derivanti dalle acque di irrigazione del vigneto.

Nei grafici successivi vengono riportate le dinamiche della popolazione microbica in vinaccia naturale non trattata e acidificata, mediante dei grafici a torta che indicano le frequenze percentuali delle specie batteriche isolate in condizioni di aerobiosi (PCP) e di microaerofilia (PCM) durante tutto il periodo dell'insilamento.

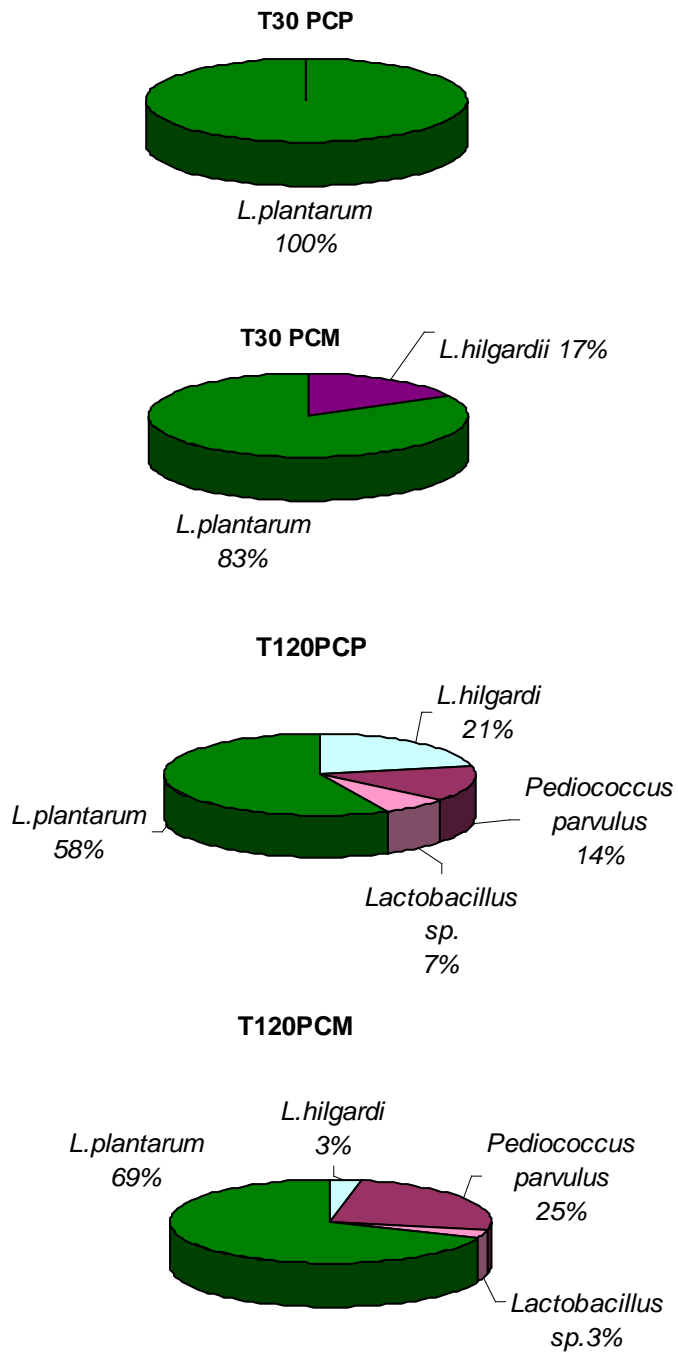


FIG.2.9 *Composizione ed evoluzione della popolazione batterica rilevata in aerobiosi (PCP) e microaerofilia (PCM) dopo 30 e 120 giorni di stoccaggio della vinaccia non trattata.*

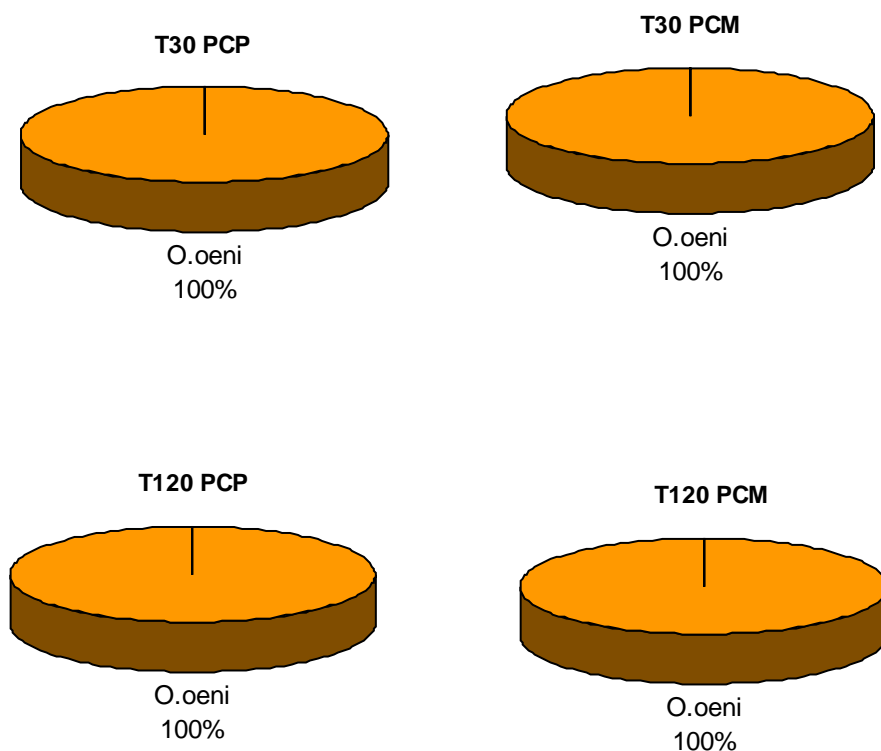


FIG.2.10 Composizione ed evoluzione della popolazione batterica rilevata in aerobiosi (PCP) e microaerofilia (PCM) dopo 30 e 120 giorni di stoccaggio della vinaccia acidificata

Dai grafici in figura 2.9 e 2.10 è possibile osservare l'evoluzione della microflora batterica durante il periodo di insilamento della vinaccia e confrontare la composizione della popolazione batterica in condizioni naturali (vinaccia non trattata) con la microflora presente in vinaccia sottoposta all'acidificazione.

A 30 giorni dall'insilamento (T30) la biodiversità si riduce e sono presenti solo due gruppi microbici nella vinaccia non trattata: il gruppo *Lactobacillus plantarum* (83%) e *Pediococcus parvulus* (17%). Al contrario nella vinaccia acidificata è stato possibile isolare solo la specie *O.oeni*. Situazione che si ripresenta in anche a 120 giorni dall'insilamento.

Dopo 4 mesi di conservazione (T120) nella vinaccia non trattata si verifica un aumento della biodiversità sia in condizioni di isolamento aerobie che di microaerofilia in quanto sono presenti 4 specie microbiche tutte appartenenti al

gruppo dei batteri lattici. Pur predominando il gruppo *Lactobacillus plantarum* (57-69%), si osserva la presenza di *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus sp.*

La microflora batterica è caratterizzata da una situazione di alta biodiversità all'inizio dell'insilamento, per poi arrivare a una situazione di dominanza di un unico gruppo microbico, i batteri lattici, nelle fasi successive. La microflora all'inizio dello stoccaggio è costituita dai microrganismi presenti sulle bucce delle uve in vigneto, e cioè prevalentemente dai batteri aerobi, le condizioni di isolamento microaerofilo hanno portato alla riduzione della frequenza di batteri acetici lasciando maggiore spazio ai lattici. Questi risultati sono in linea con dati di letteratura, in cui diverse specie di *Lactobacillus* e *Enterococcus* sono state frequentemente associate alla buccia dell'uva (Bae et al. 2006).

I risultati ottenuti dimostrano che la microflora batterica presente sulla buccia è composta da diversi gruppi microbici, ed evolve durante l'insilamento. Il maggior livello di biodiversità si riscontra all'inizio dello stoccaggio, quando la popolazione microbica è costituita da batteri lattici, acetici e *Enterobacteriaceae*. Le condizioni di stoccaggio sono state tali da non permettere lo sviluppo di specie aerobie originariamente presenti sulla superficie della bacca, che avrebbero potuto influenzare negativamente la qualità del prodotto.

Il gruppo dominante è risultato *L. plantarum* che è presente fin dall'inizio dello stoccaggio e per tutta la durata dell'insilamento resta il gruppo prevalente. Risultato che è in linea con quanto osservato nel precedente lavoro di De Pina and Hogg (1999) che a tutt'oggi rappresenta l'unica pubblicazione sulla caratterizzazione batterica di vinacce. In questo lavoro la maggior parte degli isolati batterici provenienti da vinacce di varietà di uve bianche portoghesi campionate durante un periodo di 6 mesi di insilamento, apparteneva alla specie *L. plantarum*. Anche in questo caso di studio la maggior biodiversità è stata riscontrata all'inizio dello stoccaggio, successivamente diverse specie di batteri lattici e soprattutto *L. plantarum* si sono affermate.

Il trattamento di acidificazione ha dimostrato un significativo effetto non solo nella riduzione della crescita della popolazione batterica ma anche nella sua composizione, provocando la selezione della specie meglio adattata ad ambienti acidi: *O. oeni*. Questo microrganismo è storicamente considerata tra i batteri del vino quello maggiormente adattato alle condizioni enologiche dove il pH è basso

e la concentrazione di etanolo elevata. *O. oeni* è infatti in grado di sopravvivere e crescere anche a pH di 3,2 mentre *L. plantarum* che pur ha una grande capacità di adattarsi a pH bassi rispetto agli altri lattobacilli, subisce una significativa riduzione del tasso di crescita e della concentrazione cellulare a pH 3,6 e ancor più a pH 3,2 (Alegria *et al.* 2004).

2.3.5. Scelta del sistema di analisi per la caratterizzazione a livello di ceppo degli isolati

La tecnica rep-PCR viene frequentemente utilizzata per la tipizzazione di ceppi batterici e in particolare si è dimostrata una potente mezzo per la identificazione di specie del genere *Lactobacillus* (Gevers *et al.*, 2001) e anche per discriminare tra ceppi appartenenti alla stessa specie batterica come nel caso dei batteri acetici (Papalexandratou *et al.*, 2009) e della gruppo *L.plantarum* (Kostinek *et al.*, 2008). Tra le tecniche per determinare la variabilità genetica a livello di specie e a livello intraspecifico, RAPD e AFLP sono valide alternative all'amplificazione delle sequenze ripetute (rep-PCR) e si sono dimostrate entrambe utili per effettuare discriminazioni all'interno del gruppo *L. plantarum* tra le specie *L.plantarum*, *L. paraplantarum* e *L.pentosus* (Torriani *et al.*, 2001).

La scelta della tecnica rep-PCR per la caratterizzazione ceppo specifica si è basata sui risultati di numerosi studi che la descrivono come una tecnica ad elevata ripetibilità e ad alto potere discriminante (Versalovic *et al.*, 1994; Gevers *et al.*, 2001; Mohapatra *et al.*, 2007): infatti si basa su primer a sequenza ripetuta e non a sequenza casuale come nel caso della RAPD, alla quale è stata preferita. Inoltre rispetto alla AFLP è una tecnica molto più economica e di semplice esecuzione che rende possibile un rapido screening di un ampio numero di campioni.

Per scegliere il sistema più idoneo per la tipizzazione via rep-PCR è stato condotto uno studio preliminare con diversi primer. In particolare sono stati testati sul DNA estratto da 10 isolati di *L. plantarum* e di *O.oeni* alcuni dei più utilizzati primer disegnati sui seguenti elementi ripetuti: BOX (primer BOXA1R, Versalovic *et al.*, 1994), ERIC (primer ERIC2, Versalovic *et al.*, 1991), OUTBOUND (ISRH1outR22 , Muresu *et al.*, 2005) e GTG₅ (Versalovic *et al.*, 1994).

Nella figura seguente sono riportati, come esempio, i risultati delle prove effettuate su 6 isolati di *O. oeni* dalla vinaccia e un ceppo di *E.coli* come controllo.

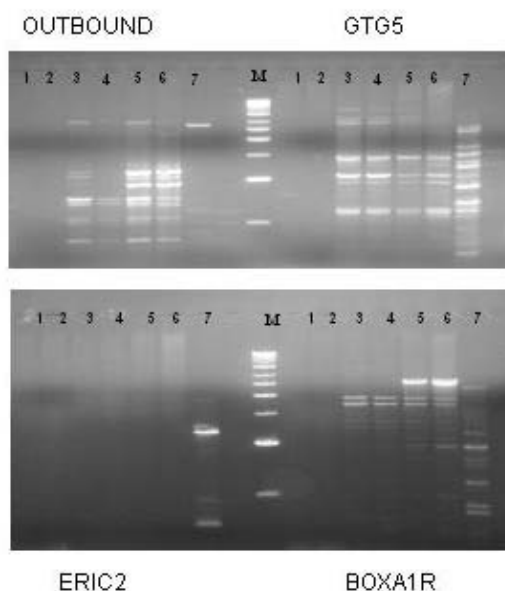


FIG 2.11 Profili ottenuti in gel di agarosio dopo rep-PCR con 4 tipi di primer applicati a 7 diversi ceppi batterici. 1-6= *O. oeni* isolati vinaccia; 7=*E. coli* (controllo); M=marcatore di peso molecolare

Dalla figura 2.11 risulta evidente che i primer ERIC2 e BOXAR1 non hanno dato risultati soddisfacenti perche le bande ottenute sono scarse o assenti (nel primo caso). Invece i primer OUTBOND e (GTG)₅ hanno permesso di ottenere dei profili complessi e con un maggior numero di frammenti amplificati. La scelta è ricaduta sul primer (GTG)₅ a seguito di altre prove effettuate su un numero maggiore di isolati che hanno evidenziato la presenza di un elevato grado di polimorfismo nei profili.

Il primer (GTG)₅ ha permesso di ottenere profili composti numerosi frammenti (10-20 bande di dimensioni comprese tra 300 e 5000 bp) e quindi è possibile ottenere maggiori informazioni maggiori rispetto a quanto si ottiene con agli altri primer tsaggiati.

Con la tecnica rep-PCR è stato effettuato uno screening degli isolati appartenenti alle specie che dall'analisi ARDRA sono risultate prevalenti in vinaccia naturale e acidificata: rispettivamente il gruppo *L.plantarum* e la specie *O.oeni*.

2.3.6. Caratterizzazione molecolare a livello di ceppo degli isolati di *L.plantarum* provenienti da vinaccia non trattata

Attraverso lo screening degli isolati appartenenti al gruppo *L. plantarum* si è voluto caratterizzare questa popolazione batterica per definire la biodiversità a livello di ceppo, allo scopo di individuare i ceppi più frequenti da sottoporre poi a una più approfondita caratterizzazione fisiologica.

In figura 2.12 è riportato un esempio dei profili ottenuti in seguito ad amplificazione mediante rep-PCR ed elettroforesi in gel d'agarosio.

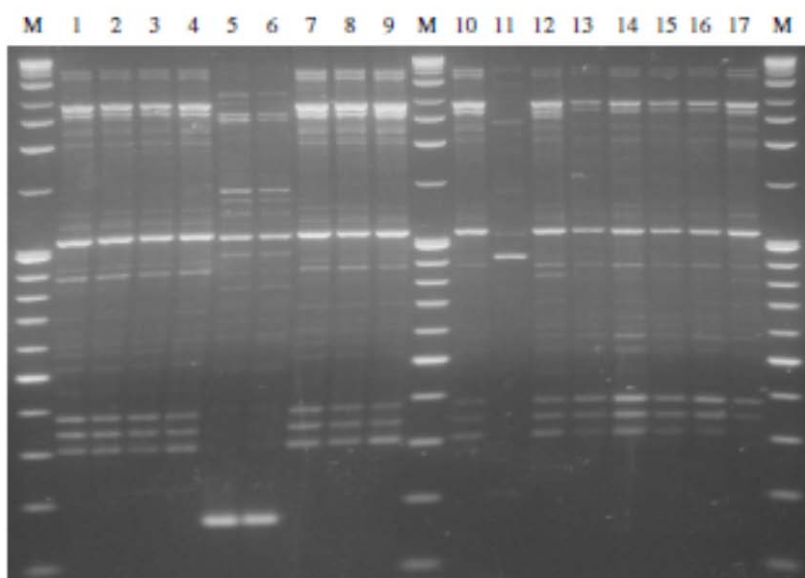


FIG. 2.12 Profili di amplificazione ottenuti con la tecnica rep-PCR per alcuni degli isolati analizzati. Corsie 2-5,8-10 e 12-19: profili degli isolati di *Lactobacillus plantarum*; 6 e 7: profili di amplificazione di un ceppo di *Lactobacillus hilgardii* usato come riferimento; M: marker 1kb+100bp (Fermentas).

I profili dei campioni che hanno dato esito positivo alla PCR sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software Gel Compar II ® (Applied Maths), ed è stato così costruito il dendrogramma riportato in figura 2.13

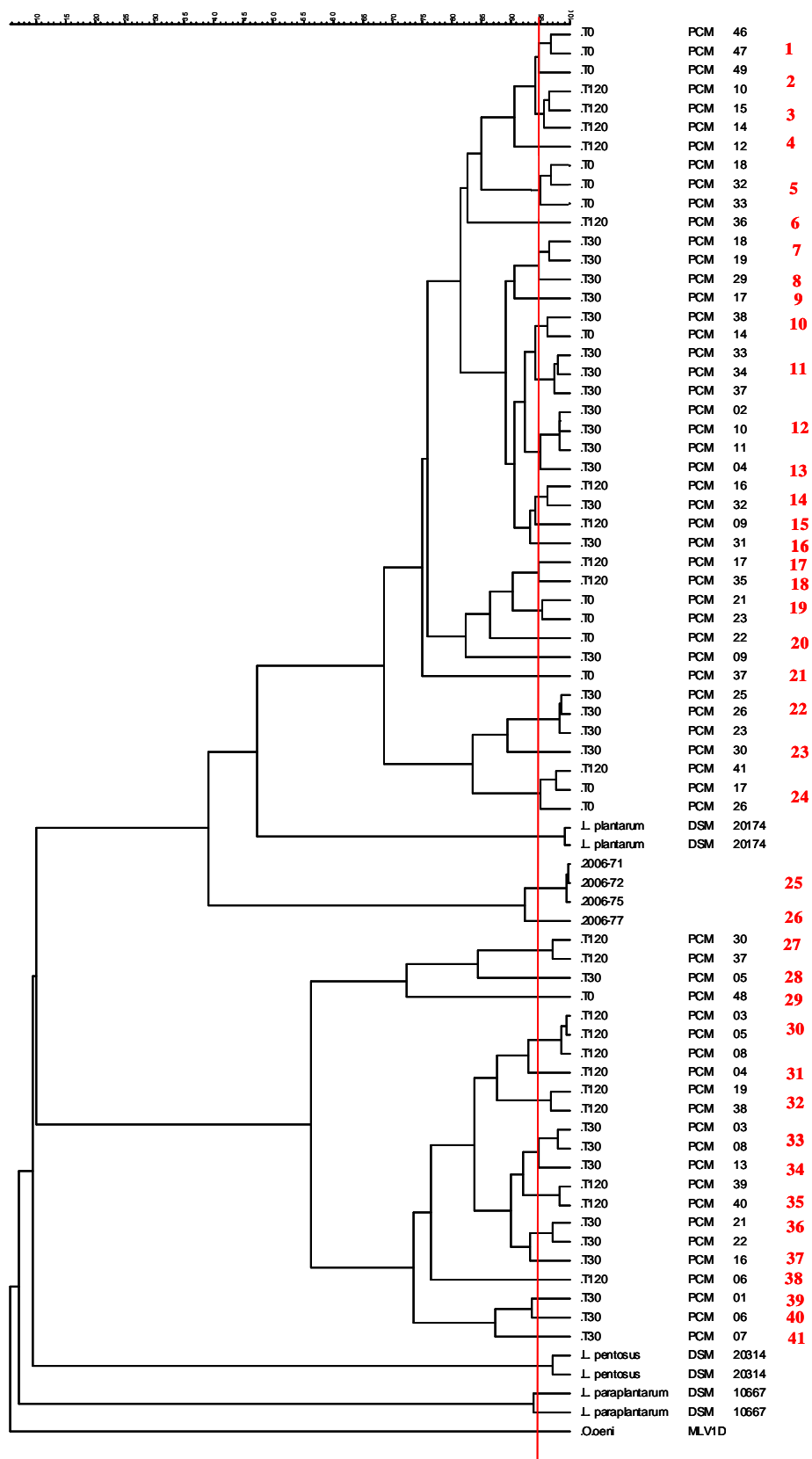


FIG. 2.13 Dendrogramma ottenuto mediante analisi dai profili rep degli isolati appartenenti al gruppo *L.plantarum* provenienti da vinaccia naturale. La linea indica il valore soglia di similarità (95%). Sono indicati nella colonna di destra i 41 cluster individuati.

Il programma GelComparII analizza i profili elettroforetici e attraverso la costruzione di una matrice, calcola il livello di similarità tra profili e crea un dendrogramma. Nella costruzione della matrice è stato utilizzato il coefficiente di similarità di Pearson che considera sia la posizione delle banda elettroforetica che la sua intensità. Nella costruzione del dendrogramma, determinato con il metodo di associazione UPMGA, i valori dei parametri “ottimizzazione” e “tolleranza”, che determinano il grado minimo di variabilità di un profilo rispetto a quello più simile, sono stati scelti in modo automatico dal software.

Per determinare il valore soglia della percentuale di similarità, al di sotto del quale i profili sono da considerarsi uguali, è stata effettuata un’analisi in triplicato per un isolato (3 amplificazioni indipendenti) e i 3 profili sono stati sottoposti all’analisi con GelComparII. In queste condizioni, si è ottenuto un grado di similarità minimo per le repliche pari al 95%. Tale valore è stato utilizzato come per definizione del numero di profili presenti. La soglia di riproducibilità ottenuta rientra nel range di valori che sono riportati in letteratura in svariati studi sulla caratterizzazione di specie batteriche in cui dall’analisi del triplicato sono stati ottenute percentuali comprese tra 89 e 96% (Gevers *et al.*, 2001; De Vuyst *et al.*, 2008). Un range di ripetibilità molto simile (89-94%) è stato ottenuto anche in studi di caratterizzazione, via (GTG)₅-PCR, a livello di ceppo di isolati di *L. plantarum* da semi di cacao fermentati.

In questo lavoro di caratterizzazione d sono stati analizzati 68 *L. plantarum* isolati provenienti da vinaccia non trattata così suddivisi rispetto ai tempi di campionamento: 14 isolati a T0, 29 isolati a T30 e 21 isolati a T120. Sono stati aggiunti anche 4 isolati provenienti da un campionamento esplorativo svolto nell’anno precedente (vendemmia 2006) inseriti per confronto. Nell’analisi sono stati inclusi anche i ceppi tipo delle specie *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum* membri del gruppo *L. plantarum* e *O. oeni*, quali batteri di riferimento. Osservando il dendrogramma è evidente in primo luogo che il profilo di *O. oeni* si discosta nettamente da tutti gli altri (con i quali ha solo il 9% di omologia) e anche i ceppi *L. paraplantarum* e *L. pentosus* sono completamente separati da tutti gli altri campioni. Questo sta ad indicare che tutti gli isolati da vinaccia sono molto più simili e vicini geneticamente alla specie *L. plantarum* che agli altri membri del suddetto gruppo, nonostante queste specie abbiano un’elevata omologia nella sequenza del DNA ribosomale 16S.

Il resto dei profili si suddividono in due grandi gruppi, in uno di essi è incluso il profilo del ceppo tipo *L. plantarum* insieme a 46 isolati, che presentano 26 profili diversi. Nell'altro raggruppamento troviamo gli altri 22 isolati, con 15 profili diversi, e nessuno dei ceppi tipo introdotti nell'analisi.

Da un'analisi più approfondita del dendrogramma si può osservare che i 14 isolati del campionamento iniziale presentano 12 profili diversi, gli isolati provenienti dal campionamento al tempo T30 risultano invece appartenere a 19 ceppi diversi, distribuiti nei due grandi gruppi, mentre i 21 campioni isolati a T120 mostrano 14 profili. I campioni isolati dalla vendemmia 2006 formano due *clustes* nettamente separati dai due grandi raggruppamenti in cui sono suddivisi tutti gli altri isolati. Ne risulta quindi un totale di 41 profili (*clusters*) ognuno dei quali è formato da 1-4 isolati che provengono sempre dallo stesso tempo di campionamento. Le uniche 3 eccezioni sono il *cluster* 10 con un isolato al tempo T30 e uno al tempo T0, il *cluster* 13 con un isolato al tempo T120 e uno al tempo T30, e il *cluster* 24 con un isolato al tempo T120 e uno al tempo T0. Nessuno dei *cluster* e quindi nessuno dei profili osservati è presente in tutti e tre i tempi di campionamento.

Nel grafico in figura 2.14 sono riportate le frequenze percentuali dei singoli *cluster*: la maggioranza dei *cluster* (il 56%) è costituito da un solo isolato quindi la maggior parte dei profili rep-PCR sono stati osservati una sola volta. Il 25% dei *cluster* è costituito da 2 isolati e il 17% invece è formato da 3 isolati. Solo un *cluster* sui 41 individuati raggruppa 4 isolati quindi questo profilo (*cluster* 12) risulta essere quello più numeroso.

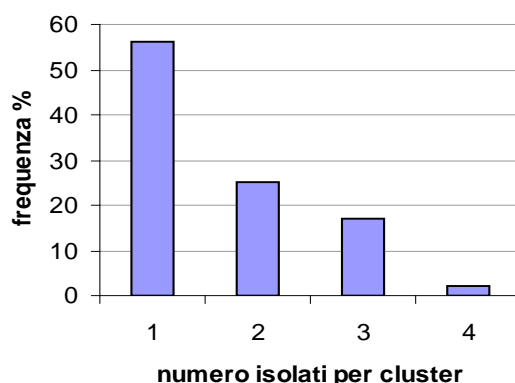


FIG 2.14 Frequenza dei profili osservati in relazione agli isolati analizzati

Questi dati mettono in evidenza una notevole evoluzione e successione di ceppi batterici, durante lo stoccaggio. Si può dunque concludere dai dati raccolti durante i 4 mesi di conservazione della vinaccia che la popolazione di ceppi appartenenti al gruppo *L. plantarum* sia estremamente dinamica e poco stabile. L'elevata frequenza di *cluster* costituiti da un solo isolato e la presenza di 41 profili su 68 isolati analizzati indica una rilevante biodiversità della popolazione analizzata, fenomeno spiegabile da una serie di caratteristiche genetiche dei batteri lattici coinvolti. La specie *L. plantarum* infatti possiede una grande eterogeneità genetica: dagli studi di genomica funzionale è emerso che il genoma di *L. plantarum* contiene una vasta zona codificante per attività coinvolte nell'adattamento a specifiche condizioni ambientali (Kleerebezem *et al.*, 2003; Chevallier *et al.*, 1994), ciò può spiegare il fatto che isolati naturali provenienti dallo stesso ambiente formino molteplici raggruppamenti tra loro mostrando differenze anche marcate da ceppi di laboratorio quali i ceppi tipo. Non solo, questo elevato grado di biodiversità potrebbe essere correlato anche alle caratteristiche fisiche della vinaccia, può essere considerata prevalentemente una matrice solida. E' possibile infatti che la sua conformazione permetta l'esistenza di molte nicchie ecologiche che preservino i batteri da scontri e competizioni.

Gli stessi isolati del gruppo *L. plantarum* sottoposti a rep-PCR sono stati analizzati anche tramite RAPD. Dall'analisi dei profili (i dati non sono riportati in questa tesi) è emersa una struttura della popolazione molto simile a quella ottenuta con la tecnica precedente. Utilizzando come soglia di similarità il 95% è stato possibile individuare in questo caso solo 10 profili diversi, dimostrando quindi che questa tecnica, in questo caso, ha un potere discriminante inferiore. Il dendrogramma ottenuto mediante RAPD risulta nettamente diviso in due parti come osservato anche dall'analisi rep-PCR: nella prima parte sono presenti la maggioranza degli isolati che si raggruppano con il ceppo tipo di *L. plantarum* mentre la seconda parte comprende gli altri isolati che non raggruppano con nessuno dei ceppi di riferimento inseriti nell'analisi. La prima parte del dendrogramma è suddivisa in 5 profili RAPD dei quali il primo è largamente prevalente e corrisponde ai profili da 1 a 21 dell'analisi repPCR. La seconda parte del dendrogramma è costituita da 5 profili RAPD che corrispondono ai profili rep dal numero 26 al numero 41.

In generale in letteratura le tecniche rep-PCR e RAPD vengono considerate due strumenti ad alto potere risolutivo per discriminare sia tra specie diverse che

all'interno della stessa specie. Ad esempio in un confronto effettuato tra la caratterizzazione degli stessi isolati di *L. plantarum* e *Pediococcus* sp. con le due tecniche diverse, è risultato che il potere risolutivo è simile, anche se la tecnica rep-PCR è risultata più ripetibile (Kostinek *et al.*, 2005).

Un'analisi più approfondita è stata a questo punto condotta per cercare di comprendere la natura dei 22 isolati che si separano nettamente dagli altri e da tutti i ceppi di riferimento, costituendo un gruppo a sé stante. Alcuni isolati sono stati perciò sottoposti a sequenziamento parziale del tratto codificante l'RNA ribosomale 16S. L'allineamento ha permesso di identificare il gruppo come appartenente alla specie *L. fabifermentans*: una nuova gruppo tassonomico descritto molto recentemente ed isolata dai semi fermentati di cacao (De Bruyne *et al.*, 2009). La similarità genetica tra questa specie e il ceppo tipo di *L. plantarum* risulta del 99% circa nel 16S-DNA e la distinzione tra le specie è resa possibile solo dall'ibridazione DNA-DNA e da alcune caratteristiche fenotipiche che riguardano la capacità di fermentare lattosio, xylosio e altri zuccheri. Data la elevata similarità genetica tra le due specie, tutti gli isolati compresi nell'analisi sono stati comunque considerati appartenenti al gruppo *L. plantarum* e sono stati tutti inseriti nelle successive caratterizzazioni fisiologiche effettuate in questo studio. Quindi un isolato per ciascuno dei 39 cluster individuati dall'analisi genetica via rep-PCR è stato scelto per una caratterizzazione fisiologica insieme al ceppo tipo della specie *L. plantarum* per un totale di 40 campioni .

2.3.7. Caratterizzazione molecolare degli isolati di *Lactobacillus plantarum* provenienti da altre matrici vegetali

Con lo scopo evidenziare le caratteristiche genetiche dei ceppi appartenenti al gruppo *L. plantarum* isolati da vinaccia, sono stati sottoposti ad analisi repPCR isolati di *L. plantarum* provenienti da diverse matrici alimentari e non. Sono stati analizzati quindi ceppi forniti dall'istituto CRA-FLC di Lodi e da dall'Istituto per la Qualità degli Alimenti (Veneto Agricoltura) di Thiene. In tabella 2.5 sono elencati i batteri analizzati e la loro provenienza. Un totale di 139 campioni di cui 43 provenienti da latte o formaggi (in azzurro nella tabella seguente) e 20 provenienti da matrici vegetali (in verde nella tabella seguente) e 8 provenienti da alimenti di origine animale , è stato sottoposto ad analisi rep-PCR.

Numero ceppi	Origine ceppi
6	Formaggio Pecorino Toscano
4	Formaggio Canestrato Pugliese
6	Formaggio Pannerone
5	Formaggio Gorgonzola
2	Formaggio Bitto Valtellina
2	Formaggio Nostrano Valtrompia
5	Formaggio Spressa
5	Formaggio Morlacco
4	Formaggio Asiago Allevato
1	Formaggio Capra
3	Latte per Formaggio Asiago Allevato
6	Verdura IV gamma
10	Olive
1	Insilati
1	Farina
2	Pasta acida
3	Insaccati
4	Insalata di mare
1	Fluido ruminale
71	TOTALE

TAB. 2.5 Elenco degli isolati di L.plantarum non provenienti da vinaccia inseriti nell'analisi genetica, con indicazione della loro origine.

I profili ottenuti sono stati analizzati con il software Gel Compare e il dendrogramma in figura 2.15 illustra i risultati dell'analisi.

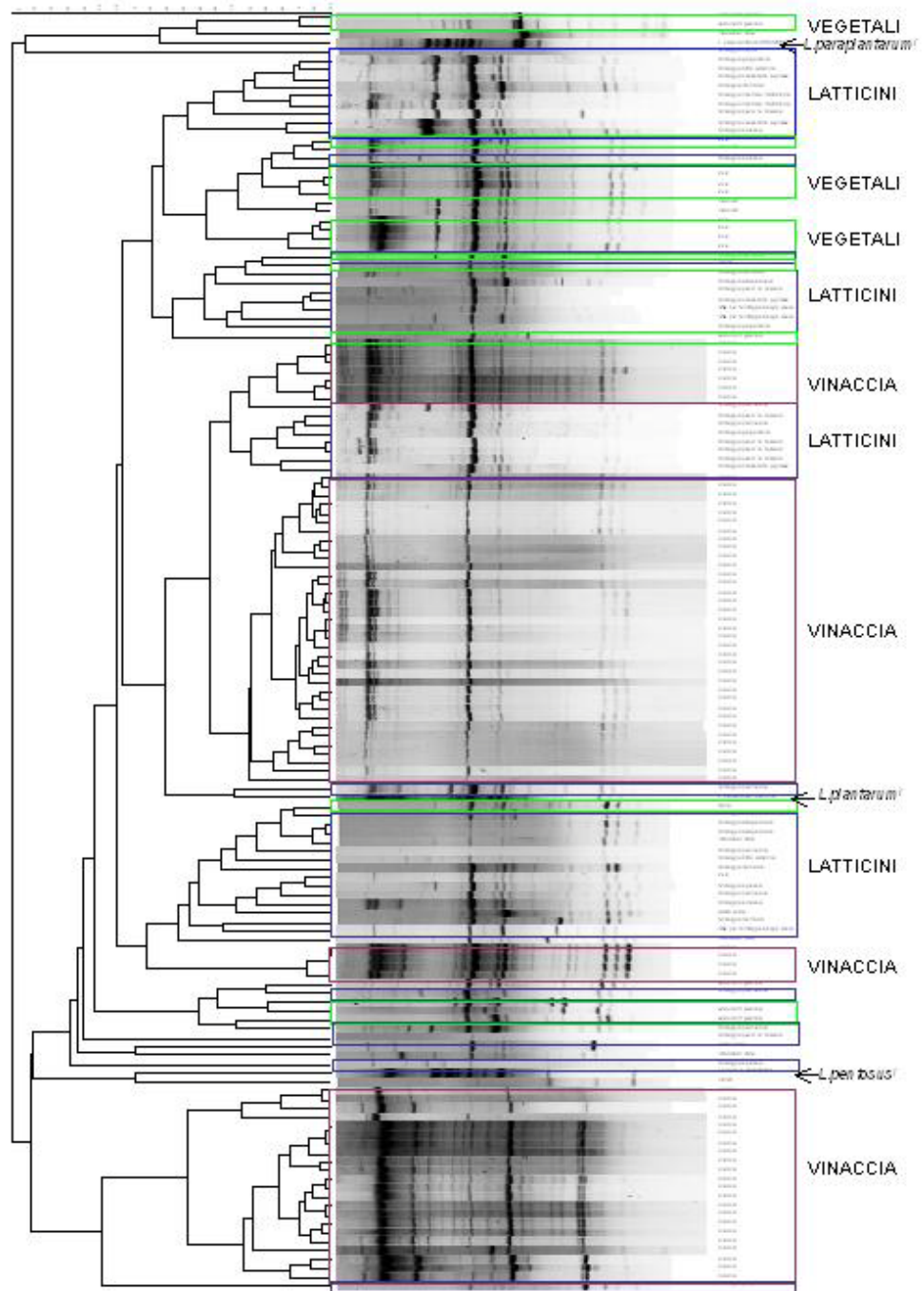


FIG. 2.15 Dendrogramma ottenuto mediante analisi dai profili rep dei ceppi appartenenti al gruppo *L. plantarum* provenienti da matrici diverse in viola i ceppi isolati da vinaccia, in azzurro quelli di origine lattiero casearia, in verde quelli isolati da altre matrici vegetali).

Questa analisi ha permesso di raggruppare molto bene tutti gli isolati a seconda delle matrici di provenienza, tranne alcuni rari casi, indicando una notevole influenza dell'ambiente di isolamento sull'evoluzione genomica. Gli isolati da vinaccia si suddividono in 4 grandi cluster mentre gli isolati provenienti da latticini e latte sono raggruppati prevalentemente in 5 grandi *cluster*, gli isolati da verdura sono riuniti in 3 gruppi.

Gli isolati da vinaccia pur evidenziando tra di loro una discreta eterogeneità sono ben identificabili tra quelli provenienti da altre matrici, dimostrando quindi che esiste tra questi ceppi una condivisione di parte del genoma e che quest'ultima si è evoluta in relazione all'ambiente. Questi risultati confermano osservazioni in letteratura che individuano nella specie *L. plantarum* un microrganismo potenzialmente in grado di adattarsi a ogni ambiente in cui si trova a vivere evolvendo caratteristiche genetiche importanti per l'adattamento e la sopravvivenza nella specifica nicchia ecologica. La complessità del genoma della specie *L. plantarum* potrebbe spiegare la notevole flessibilità di questo microrganismo e sarebbe, a questo punto, di notevole interesse capire quali caratteristiche genetiche sono specifiche tra i ceppi di diverse origini per scoprire le rispettive proprietà fisiologiche e tecnologiche.

2.3.8. Caratterizzazione molecolare a livello di ceppo degli isolati di *O.oeni* provenienti da vinaccia acidificata

La caratterizzazione molecolare a livello di ceppo della popolazione di *O. oeni* è stata condotta con le medesime modalità utilizzate per gli isolati di *L. plantarum*. Questa specie risulta l'unica presente in vinaccia acidificata ai tempi di campionamento 30 e 120 giorni.

O. oeni è una delle specie più studiate perché è il microrganismo che conduce nel modo più corretto dal punto di vista enologico la fermentazione malolattica. Sono stati sviluppati molti metodi molecolari di tipizzazione delle popolazioni di questa specie, soprattutto allo scopo di selezionare ceppi di *O.oeni* in grado di condurre efficacemente la malolattica da produrre commercialmente. Visti i tempi necessari per il suo sviluppo (circa 7 giorni in laboratorio utilizzando gli opportuni terreni di crescita) e le esigenze nutrizionali, risulta spesso molto utile effettuare una prima caratterizzazione molecolare degli isolati e poi sottoporli alla caratterizzazione tecnologica. Per questi motivi sono stati sviluppati molti metodi molecolari per identificare questa specie, tra i quali alcuni prevedono l'amplificazione mediante PCR con primer specie-specifici disegnati sulla sequenza del gene che codifica per l'enzima malo lattico (Zapparoli *et al.*, 1998), il sequenziamento multi locus basato sull'amplificazione di diversi geni ad esempio coinvolti nella resistenza a stress chimico (Sico *et al.*, 2009; Renouf *et al.*, 2008) e la RAPD (Reguant *et al.*, 2003).

La specie *O.oeni* era considerata una specie relativamente omogenea cioè con poche differenze genetiche a livello intraspecifico, ma le recenti tecniche molecolari sviluppate come RAPD e il sequenziamento multi locus, unite alle enormi informazioni ottenute dal sequenziamento del genoma di *O.oeni*, hanno permesso di rivelarne una inattesa biodiversità (Bon *et al.*, 2009).

In questo lavoro di tesi è stata condotta una tipizzazione della popolazione di *O.oeni* mediante la tecnica rep-PCR con il primer (GTG)₅ già utilizzata per la caratterizzazione della popolazione di *L. plantarum*. Sono stati analizzati un totale di 56 isolati appartenenti alla specie *O.oeni* provenienti da vinaccia acidificata dei quali 22 isolati al tempo 30 giorni e 34 al tempo 120 giorni. Ai 56 isolati da vinaccia sono stati aggiunti 10 isolati da vino raboso (denominati con la sigla RML) come ceppi di controllo. Inoltre nell'analisi sono stati inseriti anche il ceppo tipo della specie *O.oeni* e due ceppi commerciali largamente usati come starter malolattici (ALFA, Lallemand e MLV1D, Bioagro). I ceppi ottenuti da

vino raboso sono stati isolati durante un precedente progetto di selezione di enococchi per la fermentazione malolattica. La caratterizzazione a livello di ceppo è stata effettuata in precedenza la tecnica RAPD.

Il DNA estratto come descritto nel capitolo dei materiali e metodi, è stato amplificato con il primer (GTG)₅ e i frammenti ottenuti sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio. I profili elettroforetici sono stati analizzati mediante l'utilizzo del software Gel Compar II[®] (Applied Maths), ed è stato così costruito il dendrogramma riportato in figura 2.16. Nella costruzione della matrice è stato utilizzato il coefficiente di similarità di Pearson che considera sia la posizione delle banda elettroforetica che la sua intensità. Nella costruzione del dendrogramma, determinato con il metodo di associazione UPMGA, i valori dei parametri "ottimizzazione" e "tolleranza", che determinano il grado minimo di variabilità di un profilo rispetto a quello più simile, sono stati scelti in modo automatico dal software.

Per l'individuazione dei *cluster* è stata considerata come soglia di similarità la percentuale del 95% corrispondente al grado minimo di similarità tra i profili ottenuti dall'amplificazione di un campione in triplicato.

L'analisi rep-PCR ha permesso di individuare 41 profili diversi (*cluster*) tra i 56 isolati da vinaccia. Possiamo affermare quindi che la biodiversità è decisamente alta in questa popolazione, considerando che maggior parte dei profili sono unici infatti il 78% dei *cluster* è costituito da un solo isolato, il 12% dei *cluster* raggruppa 2 isolati e il 5% raggruppa 3 isolati mentre solo in piccola percentuale (5%) i *cluster* contengono 4 o 5 isolati .

Nessuno dei profili individuati tra gli isolati da vinaccia al tempo 30 giorni si ritrova al tempo di campionamento successivo, indicando una successione temporale della popolazione durante l'insilamento. I profili individuati per gli isolati a T30 sono nettamente separati da quelli ottenuti a T120 quindi le due popolazioni di individui sono molto diverse geneticamente. Come osservato per la popolazione del gruppo *L. plantarum*, anche per *O.oeni* c'è una netta alternanza di popolazioni durante l'insilamento, ancora maggiore per gli enococchi, perché nessuno dei profili trovati al tempo 30 giorni si ritrova anche a 120 giorni.

Gli isolati da vino raboso inseriti nella presente analisi (campioni RML nel dendrogramma) sono stati scelti perché da una precedente caratterizzazione mediante analisi RAPD, essi rappresentavano 10 profili diversi nettamente separati geneticamente. L'analisi rep-PCR ha effettivamente separato tutti e 10 gli

isolati provenienti da vino raboso, riconoscendoli come profili unici e diversi tra loro. Interessante notare che i ceppi RML sono ben distinti da quelli provenienti da vinaccia, infatti fanno parte di un gruppo a sé stante. Solo i campioni RML59 e 139 sono vicini ad alcuni isolati da vinaccia al tempo T30 e uno (il ceppo RML 04) è molto simile al ceppo commerciale MLV1D.

Questi dati indicano una certa omogeneità genetica della popolazione di *O.oeni* proveniente da vinaccia, che risulta quindi geneticamente distinta da quella isolata da raboso. Ulteriori studi sarebbero necessari per confrontare le caratteristiche fisiologiche e tecnologiche delle due popolazioni, per capire se esistono delle proprietà specifiche della popolazione da vinaccia, che la differenziano da quella isolata da vino raboso. Ad esempio sarebbe interessante analizzare la capacità di condurre la fermentazione malolattica da parte di ceppi isolati dalle due popolazioni per capire quanto geneticamente l'ambiente vino possa influenzare questo carattere rispetto all'ambiente vinaccia in cui questa proprietà metabolica è meno importante.

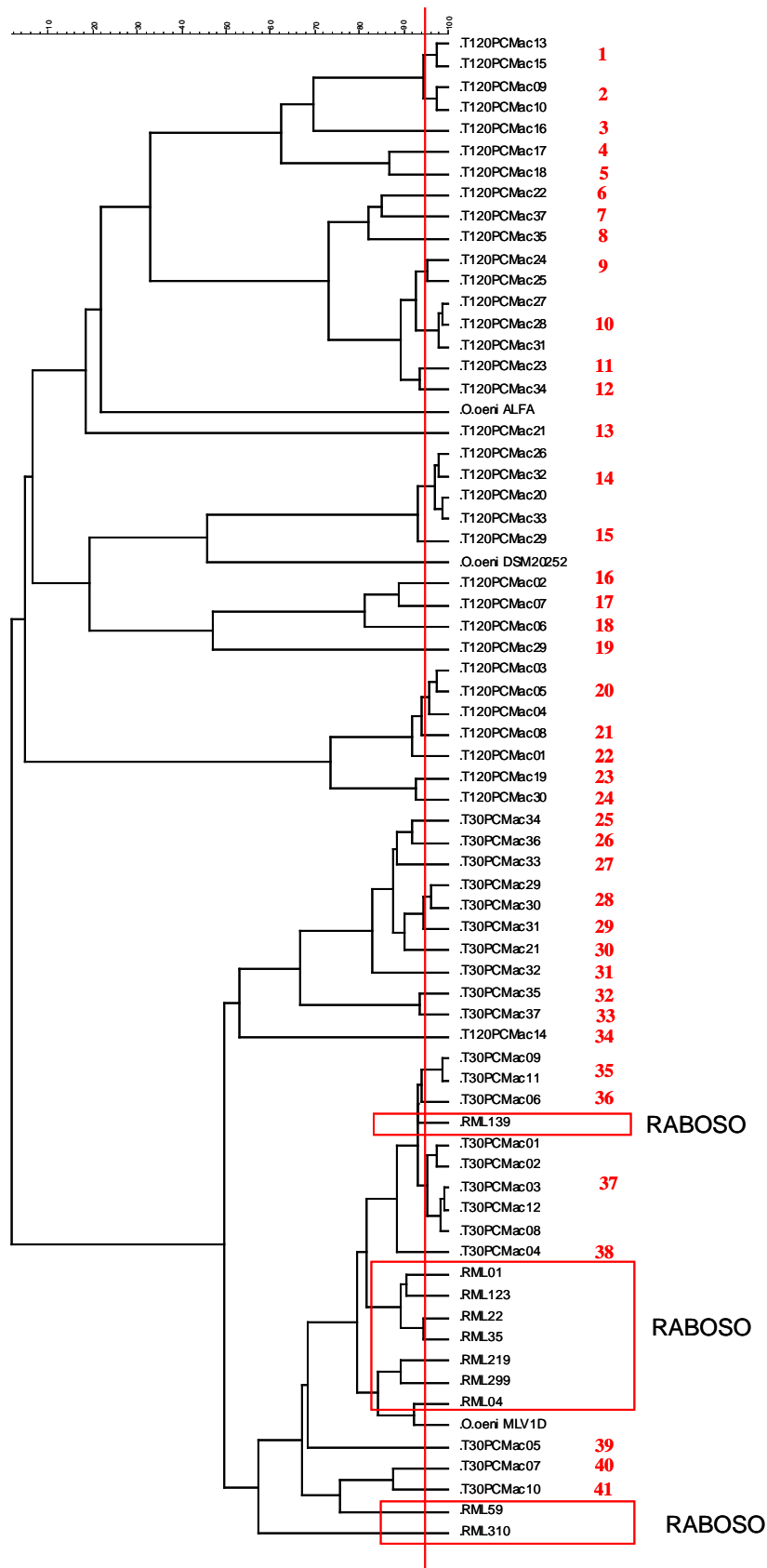


FIG. 2.16 Analisi di similarità relativa ai profili rep ottenuti dagli isolati di *O.oeni* provenienti da vinaccia acidificata e da vino raboso. La linea indica il valore soglia di similarità (95%). Sono indicati nella colonna di destra i 41 cluster individuati per gli isolati da vinaccia.

**3. CARATTERIZZAZIONE FISIOLOGICA DEGLI ISOLATI
APPARTENENTI ALLA SPECIE DOMINANTE NELLA
VINACCIA NATURALE**

3.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo sono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione fisiologica della popolazione risultata dominante in vinaccia di Prosecco non sottoposta al trattamento di acidificazione. Come descritto nel capitolo precedente, il gruppo *L. plantarum* è presente con frequenza rilevante fin dall'inizio dell'insilamento della vinaccia, proviene dal vigneto e durante lo stoccaggio della vinaccia si afferma come il microrganismo dominante della microflora batterica.

Per approfondire la conoscenza di questa popolazione e cercare di capire quali sono le proprietà che possono risultare importanti per spiegare l'effetto di dominanza sulla microflora delle vinacce è stato scelto di indagare alcuni particolari aspetti fenotipici che potrebbero essere implicati.

3.1.1 La specie *L. plantarum*

Classificazione tassonomica, come riportato da www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy (sito ufficiale per la tassonomia batterica):

Phylum *Firmicutes*

Classe *Bacilli*

Ordine *Lactobacillales*

Famiglia *Lactobacillaceae*

Genere *Lactobacillus*

Gruppo II: eterofermentanti facoltativi

Specie *L. plantarum*

Sub specie *L. plantarum* subsp. *plantarum*

L. plantarum subsp. *argentoratensis*

Si tratta di microrganismi Gram positivi, con forma a bastoncino, le dimensioni medie sono 1x3.8µm, generalmente in forma singola, in paia o in corte catenelle, in condizioni di anaerobiosi formano alla superficie dei terreni delle colonie di circa 3mm di diametro rotondeggianti e compatte di colore bianco. Sono un microrganismo omofermentante, facoltativamente eterofermentante e microaerofilo fermenta il glucosio, il fruttosio e il saccarosio e numerosi altri carboidrati. Le condizioni ottimali di crescita sono 30-35°C. Sono batteri molto

vigorosi e in condizioni adatte sviluppano rapidamente e intensamente. Sono agenti della fermentazione malolattica (Zambonelli *et al.*, 2005)

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 (Kleerebezem *et al.*, 2003). Recentemente è stata completata la sequenza di un secondo genoma (ceppo JDM1) con diverse funzioni probiotiche (Zang *et al.* 2009).

Questi studi hanno rivelato la gran complessità del genoma che nel caso del ceppo WCSG1 è di $3,3 \times 10^6$ bp, possiede circa 3000 geni che codificano per circa 320 proteine putative delle quali sono state identificate circa il 70% e molte di esse sono coinvolte nel trasporto cellulare, infatti circa il 13% sono trasportatori o proteine di legame, 8% sono proteine con funzione regolativa, 8% sono coinvolte nel metabolismo energetico. Il genoma ha 3 plasmidi extracromosomici e una regione chiamata "*lifestyle adaptation island*", vicina all'origine della replicazione, che codifica per proteine implicate nel trasporto di zuccheri e nel metabolismo, e per proteine regolatrici. Questa regione genomica sarebbe particolarmente importante per l'adattamento ai diversi habitat in quanto responsabile della regolazione e sintesi degli enzimi coinvolti nell'utilizzo delle diverse fonti di carbonio e nelle interazioni con l'ambiente.

3.1.2 *L.plantarum* in enologia

Questa specie ha una rilevanza particolare in enologia: grazie alla sua capacità di condurre la fermentazione malolattica questo batterio 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 amine biogene e l'etilcarbammato (Lonvaud-Funel, 1999). La sua importanza nella microbiologia della vinaccia

utilizzata per la produzione di distillati è stata ipotizzata da De Pina e Hogg (1999) nell'unico lavoro pubblicato finora sull'argomento, dove *L.plantarum* è risultato essere la specie maggiormente presente durante la fase di conservazione della matrice vegetale. Si tratta di una specie ben adattata all'ambiente enologico: rispetto ad altre specie di batteri lattici. Infatti, *L. plantarum* proveniente dall'ambiente enologico cresce bene anche a pH bassi: fino a 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 (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 zuccheri a 5 atomi di carbonio come ribosio, attraverso la via dei pentosi fosfati. Questa specie possiede anche una serie di *pathway* alternativi per metabolizzare acidi organici in carenza di zuccheri. Queste vie metaboliche sono estremamente importanti per *L.plantarum* perché gli permettono di sfruttare una serie di composti largamente presenti in vino, tra questi l'acido citrico, il glicerolo, l'acido tartarico e soprattutto l'acido malico attraverso la fermentazione malolattica. Questa singolare fermentazione ha come effetto principale la riduzione dell'acidità del vino rendendolo più morbido e consiste nella decarbossilazione dell'acido malico ad acido lattico ad opera dell'enzima malolattico. 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 uno 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.

Infine il metabolismo dell'azoto può essere utilizzato da *L.plantarum* per ricavare energia diretta da alcuni aminoacidi in assenza di altri nutrienti, tra gli aminoacidi più presenti in vino ricordiamo l'alanina, glutammina, glutammato, arginina e prolina (>100 mg/l). Questo metabolismo viene molto studiato perché dalla degradazione degli aminoacidi alcuni batteri lattici tra cui *L.plantarum*, possono

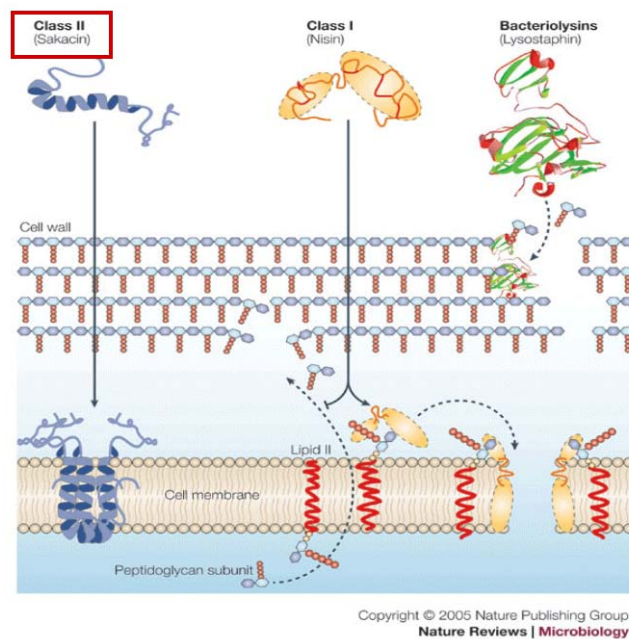
produrre le amine biogene: basi organiche a basso peso molecolare che ad alte concentrazioni provocano mal di testa, allergie, problemi respiratori e cardiaci. Le più importanti amine biogene sono: istamina (dall'istidina), putrescina (da arginina o ornitina), tiramina (dalla tirosina). La più frequente in vino è la putrescina prodotta dall'arginina che è l'aminoacido maggiormente presente nel mosto. In letteratura ci sono forti indicazioni che *L.plantarum* non sia tra i maggiori produttori di amine 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 malo lattico in quanto potrebbe condurre la fermentazione malolattica senza rischi di alterazioni dovute alla produzione di amine biogene. (generalmente sintetizzate da *O. oeni*, principale specie proposta come starter).

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

3.1.3 Le batteriocine

La produzione di batteriocine conferisce un vantaggio competitivo nei confronti di altri batteri che vivono nella stessa nicchia ecologica e competono per gli stessi nutrienti, ma le batteriocine hanno anche il ruolo di impedire la colonizzazione di un habitat da parte di altre specie.

Le batteriocine sono delle piccole proteine o peptidi che vengono prodotte da moltissimi batteri sia Gram positivi che Gram negativi, hanno proprietà cationiche e distruggono le cellule bersaglio destabilizzando l'integrità della membrana cellulare, a causa della distruzione del potenziale di membrana o della creazione di pori nella membrana stessa. Sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche queste proteine sono state classificate in 2 classi: la classe I detta dei lantibiotici ha come principale esponente la nisina, la classe II detta non-lantibiotici raggruppa una serie di batteriocine molto diverse tra loro, che sono ulteriormente suddivise in : batteriocine IIA come la pediocina, batteriocine IIB come la plantaricina, batteriocine classe III che vengono attualmente riclassificate come batterio lisine (Cotter *et al.*, 2005) .



*FIG.3.1 Confronto del meccanismo d'azione delle tre classi di batteriocine
Tratto da Cotter et. al. 2005*

Le batteriocine di classe I sono dei piccoli peptidi che contengono il dominio “lantionina” e in generale agiscono mediante la formazione di pori sulla membrana provocando la dissipazione del potenziale di membrana e il conseguente efflusso di metaboliti dalle cellule bersaglio. Esse possiedono due distinti meccanismi d'azione: possono legarsi al trasportatore di peptidoglicani sito sulla membrana plasmatica impedendo la sintesi della parete cellulare, oppure possono legarsi al trasportatore stesso e formare un poro sulla membrana plasmatica che porta alla morte cellulare. Un esempio è la nisina che fu descritto per la prima volta nel 1933 in Nuova Zelanda e nel 1953 fu brevettata in Gran Bretagna per il suo utilizzo come conservante naturale. E' stata approvata dalla Fao come sicura ed è inserita nella lista degli additivi permessi per usi alimentari in Europa ed è stata anche approvata dalla US Food and Drug Agency per l'uso alimentare.

Le batteriocine di classe II invece sono piccoli peptidi termostabili, che contrariamente alla classe I non sono soggette a modifiche post-traduzionali, esse agiscono inducendo la permeabilizzazione della membrana e conseguente fuoriuscita di molecole dalle cellule bersaglio. Esse possiedono normalmente una struttura ad alfa elica che si inserisce nella membrana della cellula bersaglio. All'interno di questa categoria possiamo individuare 2 sottogruppi: le batteriocine

“pediocin-like” (tipo IIA) che hanno un ristretto spettro d’azione e sono in genere molto specifiche contro la specie *Listeria monocytogens*, e le batteriocine a 2 peptidi (tipo IIB) come la plantaricina.

Le batteriocine sono normalmente sintetizzate sottoforma di un pre-peptide inattivo e poi tagliate per ottenere la forma matura durante il loro trasporto grazie al trasportatore ABC. Inoltre i batteri produttori di batteriocine possiedono un sistema di autoimmunità verso le batteriocine da loro prodotte, sistema basato su proteine immunitarie che agiscono sequestrando la batteriocina “self” o mediante un meccanismo di competizione per il recettore.

La produzione di batteriocine nei batteri gram positivi è un meccanismo molto complesso sottoposto a un fine controllo. Nelle batteriocine di classe I è regolato da un meccanismo di quorum sensing che si basa sulla concentrazione cellulare e avviene per autoinduzione: la batteriocina funziona da ferormone e induce la sua stessa sintesi al raggiungimento di una concentrazione cellulare soglia. Invece per le batteriocine di classe II il meccanismo è regolato da un sistema di quorum sensing mediato da ferormoni o da peptidi induttori per cui la regolazione coinvolge la batteriocina, il fattore di induzione, il trasportatore e peptidi accessori.

3.1.3.1 *Batteriocine in L.plantarum*

L.plantarum è una specie che viene utilizzata nei processi di conservazione degli alimenti grazie alla sua capacità di produrre composti antimicrobici come acidi organici (acido lattico soprattutto), perossido d’idrogeno, diacetile, acetoino e batteriocine (Simova *et al.*, 2009). *L.plantarum* è noto per produrre molti tipi di batteriocine diverse a seconda del diverso ceppo. Tali batteriocine vengono chiamate plantaricine e rientrano nella classe I (plantaricina C e W), nella classe IIA (plantaricina C19 e 423) e nella classe IIB (plantaricina EF, JK, S, NC8) come è stato descritto da Knoll e colleghi (2008).

Precedenti studi hanno dimostrato che la produzione di batteriocine richiede la presenza di un induttore: il microrganismo induttore deve essere vicino e a una certa concentrazione cellulare per poter scatenare la produzione di batteriocine, inoltre l’induttore non sempre coincide con il microrganismo bersaglio dell’attività antimicrobica (Maldonado *et al.*, 2004; Diep 1996).

La produzione di plantaricine è influenzata dalla fase del ciclo cellulare, dalle condizioni di pH, nutrienti ed etanolo, dalla temperatura di crescita infatti il picco di produzione si ha all’inizio della fase stazionaria ed è più velocemente raggiunto

a temperature prossime ai 30°C (Navarro *et al.*, 2000). In alcuni ceppi l'attività antimicrobica risulta visibile attorno alle 24 ore di incubazione, mentre in altri le plantaricine vengono sintetizzate durante la fase di crescita esponenziale (Navarro *et al.*, 2000; Todorov e Dicks, 2005).

Recentemente è stato ipotizzato un meccanismo di regolazione della produzione di batteriocine, tramite *quorum sensing* in un ceppo di *L.plantarum* isolato da vino rosso (Navarro *et al.*, 2008). E' stato dimostrato infatti che la trascrizione di un operone del *locus* per la sintesi delle plantaricine viene regolata sulla base della concentrazione cellulare: quando la concentrazione cellulare del ceppo supera 10⁷ CFU/ml il fattore di regolazione *plnA* supera una soglia critica e attiva la sua trascrizione e la trascrizione dei geni dell'operone, portando all'accumulo di plantaricine.

Nella maggior parte dei casi le plantaricine sono attive contro microrganismi che competono con la nicchia ecologica in cui vive il ceppo produttore di *L.plantarum*. Si tratta soprattutto di altri batteri lattici e alcuni Gram positivi.

Nel caso del vino, alcuni lavori hanno dimostrato l'attività antimicrobica di molti isolati enologici di *L.plantarum*, soprattutto attivi contro *L.hilgardii*, *L.brevis*, *L.fermentum*, e in alcuni casi *O.oeni* e *Pediococcus* spp. (Knoll *et al.*, 2008; Rojo-Besarez *et al.*, 2007 ; Navarro *et al.*, 2000). Il vino è un ambiente aggressivo dove *L.plantarum* si trova a dover competere per i nutrienti, la capacità di produrre batteriocine sarebbe un vantaggio per i membri di questa specie nei confronti degli altri batteri. Dal punto di vista tecnologico, la produzione di batteriocine da parte di ceppi di *L.plantarum* potrebbe essere utile per controllare lo sviluppo della microflora durante il processo di vinificazione riducendo l'impiego di altre sostanze chimiche come la solforosa.

Negli studi pubblicati finora, ceppi isolati dal mosto dimostrano spesso un'attività antimicrobica vincolata alla presenza in co-coltura con un microrganismo induttore (Knoll *et al.*, 2008; Rojo-Besarez *et al.*, 2007). Inoltre spesso si è osservata la dipendenza dell'attività antimicrobica dal pH e dalla concentrazione di etanolo infatti pH acidi al di sotto di 6 e una concentrazione di etanolo maggiore del 4% già inibiscono l'attività antimicrobica (Rojo-Besarez *et al.*, 2007).

LOCUS PLN

Finora sono stati caratterizzati 5 diversi loci per i geni delle plantaricine di 5 diversi ceppi di *L.plantarum*, ciascun locus contiene circa 25 geni per un totale di 18000bp circa organizzati mediamente in 5 operoni. Tutti i loci contengono una

parte conservata che comprende l'operone che codifica per la batteriocina e per un trasportatore, e una parte meno conservata che comprende tra l'altro dei geni regolatori (Diep *et al.*, 2009). In particolare, nei sistemi maggiormente conosciuti ad oggi, l'operone ABCD codifica per un peptide induttore con struttura simile alla batteriocina (plnA), per una chinasi (plnB) e per 2 regolatori cellulari (plnC e D). L'operone GHSTUV è collegato al trasporto, mentre gli altri 3 operoni sono associati alla produzione di plantaricine e all'autoimmunità. Uno studio sulla biodiversità dei geni pln ha rivelato la forte similarità di essi tra molti ceppi di *L.plantarum* enologici (Saenz *et al.*, 2009).

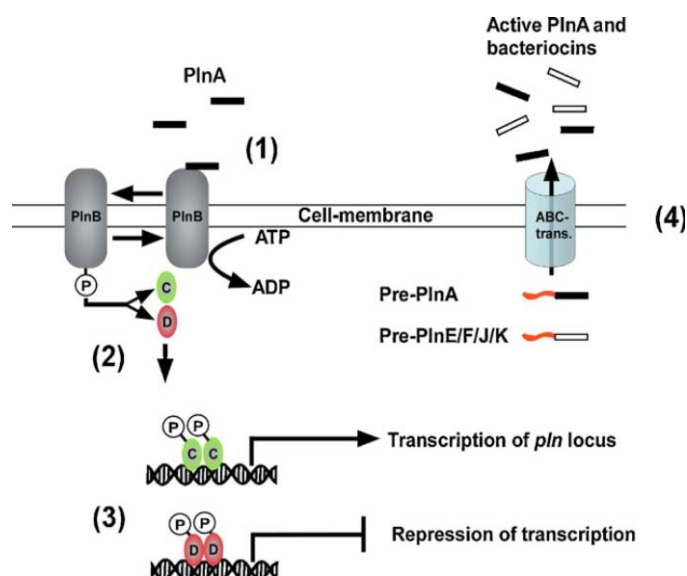


FIG.3.2 Cascata di eventi nella via di regolazione che porta alla trascrizione del gene *pln*. Tratto da Diep *et al.* 2009

3.1.4 Il biofilm

Confrontati con gli organismi pluricellulari i microrganismi sono spesso visti come creature più semplici tuttavia essi sono in grado di differenziarsi e nell'ambiente naturale essi sono raramente in forma individuale: la forma multicellulare detta biofilm sembra prevalere, soprattutto in condizioni di stress ambientale e carenza di nutrienti.

Per biofilm si intende la comunità microbica adesa a un substrato e che può anche comprendere microrganismi appartenenti a diverse specie(biofilm multi specie).

L'importanza a livello clinico di quello che noi oggi chiamiamo biofilm, è nota da almeno 40 anni, quando fu pubblicata la scoperta di una struttura avvolta da

esopolisaccaridi formata dal batterio *Streptococcus mutans* sulla superficie dei denti.

Negli ultimi anni è cresciuto enormemente l'interesse verso questo argomento e numerosissimi sono gli studi che lo hanno riguardato, allo scopo di comprenderne il funzionamento, la regolazione e gli aspetti molecolari soprattutto nei batteri e in particolar modo nel settore medico vista la rilevanza clinica del fenomeno. Ora sappiamo infatti che il biofilm è un fondamentale aspetto di moltissime patologie batteriche umane come l'endocardite, le carie dentali, le infezioni dell'orecchio, le infezioni degli impianti oculari e delle protesi mediche (Jefferson 2004).

L'osservazione di molti habitats naturali ha dimostrato che anche in natura, nella maggior parte dei casi i batteri vivono adesi a una superficie all'interno di una struttura a biofilm invece che nella modalità libera e all'interno di questa matrice i microrganismi hanno delle relazioni cooperative complesse tra di loro.

In campo ambientale ci sono molti esempi di biofilm che sono stati largamente studiati solo recentemente, grazie alla scoperta dell'importanza del biofilm in microbiologia. Le strutture più studiate sono le acque di scarico e la rizosfera. Nei bioreattori anaerobici per la bonifica delle acque di scarico, i batteri anaerobici hanno un ruolo fondamentale nella degradazione della sostanza organica e si è scoperto che essi crescono formando biofilm alla superficie degli impianti. I batteri del suolo invece crescono nella rizosfera perché si tratta di una zona ricca di nutrienti grazie al rilascio di essudati, gas e altri composti secreti dalla pianta a livello radicale. Qui i batteri formano biofilm alla superficie delle radici delle piante, fenomeno che è stato studiato in *Pseudomonas fluorescens* (Davey e O'Toole, 2000).

Omologie tra biofilm e processi di sviluppo microbiologico sono evidenti ad esempio per i corpi fruttiferi di *Myxococcus xanthus*. Questo batterio, in condizioni di abbondanza di nutrienti, si presenta in forma vegetativa mentre in condizioni di carenza nutritiva smette di accrescersi e si aggrega formando una struttura pluricellulare detta corpo fruttifero, struttura nella quale alcune cellule evolvono per diventare mixospore che sono in grado di ritrasformarsi in cellule vegetative quando le condizioni esterne ridiventano favorevoli. È stato dimostrato che esistono cascate di geni specifiche che attivano questo processo di differenziamento (Jefferson 2004).

Il processo di formazione del biofilm può essere suddiviso in 4 parti come illustrato in figura 4: attacco alla superficie, formazione di micro colonie, formazione di macrocolonie e maturazione del biofilm, disgregazione del biofilm.

Il passaggio dalla fase planktonica all'adesione al substrato avviene in due step il primo dei quali è reversibile e consiste in una adesione debole dovuta a legami deboli, il secondo step è irreversibile ed è un meccanismo attivo di riconoscimento e adesione specifica tra le cellule e il substrato. Successivamente si formano gruppi di cellule dette micro colonie, per crescita clonale o per inglobamento di altre cellule planktoniche, infine le micro colonie crescono e formano strutture a fungo dette macrocolonie. Nel biofilm maturo le cellule sono trattenute insieme da una matrice di esopolisaccaridi prodotti da esse stesse. Un'ultima fase consiste nella disgregazione della struttura e rilascio delle cellule che ritornano allo stato planktonico (Monds e O'Toole, 2009).

Osservazioni al microscopio confocale con l'uso di sonde fluorescenti, hanno permesso la descrizione della struttura interna del biofilm. Si trovano infatti tra le micro colonie, dei canali permeabili all'acqua che permettono il trasporto di fluidi e gas alle cellule che compongono il biofilm, come un primitivo sistema circolatorio (Davey e O'Toole, 2000).

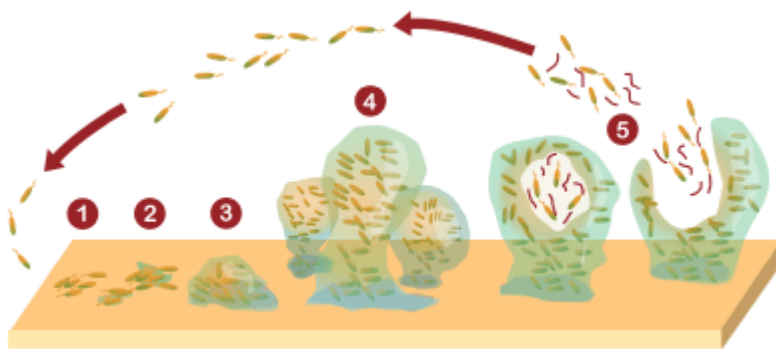


FIG.3.3 stadi di formazione e maturazione del biofilm: 1=adesione aspecifica alla superficie;2=legame specifico e riconoscimento cellulare; 3=formazione di micro colonie e rilascio di esopolisaccaridi; 4=formazione di macrocolonie e maturazione del biofilm; 5=disgregazione del biofilm e rilascio di cellule in forma planktonica.

Il forte interesse verso questo argomento ha portato anche ad alcune ipotesi sul significato e il ruolo del biofilm per i microrganismi. Moltissime sono le evidenze sperimentali di un incremento nella resistenza agli antibiotici o agli stress ambientali come pH acido e alte percentuali di etanolo (Kubota *et al.*, 2008; Burmolle *et al.*, 2006), e a partire da queste sono state formulate delle ipotesi sui vantaggi della crescita all'interno di un biofilm da parte di molti microrganismi. Si ipotizza che il biofilm possa rappresentare una risposta di difesa alle condizioni

sfavorevoli, oppure una colonizzazione di ambienti ricchi di nutrienti, o un modo per sfruttare i vantaggi di una cooperazione all'interno di una comunità di microrganismi. Alcuni studiosi ipotizzano anche che potrebbe essere proprio il biofilm la modalità standard di crescita mentre le colture planctoniche sarebbero un artefatto delle condizioni di laboratorio (Jefferson 2004). Sicuramente i microrganismi all'interno del biofilm si avvantaggiano di una protezione dall'ambiente circostante grazie alla presenza della matrice esopolisaccaridica che contribuirebbe allo smaltimento di sostanze tossiche, assorbirebbe i composti organici dal fluido esterno e concentrerebbe i nutrienti, ma svolgerebbe anche il ruolo di barriera fisica contro numerosi agenti antimicrobici come antibiotici, raggi UV, radiazioni, shock osmotici, pH acidi, essiccazione. Inoltre nei biofilm costituiti da diverse specie, esiste una distribuzione fisica dei microrganismi all'interno della struttura, in risposta ai gradienti chimici e questo permette un ottimale adattamento alle condizioni ambientali. Ad esempio in relazione alla disponibilità di ossigeno all'interno del biofilm, è stato dimostrato che microrganismi a metabolismo aerobio crescono alla superficie dove maggiore è la concentrazione di ossigeno, lo strato immediatamente sottostante invece è formato da microrganismi fermentanti, che in assenza di ossigeno possono metabolizzare i nutrienti che ancora riescono a penetrare all'interno (Stewart and Franklin, 2008). Inoltre nei biofilm multi specie, si assiste a una cooperazione metabolica in cui microrganismi di diverse specie sfruttano i metaboliti rilasciati da un'altra specie come fonte energetica (Davey and O'Toole 2000).

3.1.4.1 *Biofilm in L.plantarum*

Anche la specie *L.plantarum* è in grado di formare biofilm, infatti ci sono in letteratura delle evidenze sperimentali della formazione di biofilm da parte di isolati di *L.plantarum* in diversi ambienti: vista la molteplicità di nicchie ecologiche in cui si trova questa specie, potrebbe trattarsi di un importante risposta di difesa alle condizioni più drastiche che ritroviamo negli ambienti tipici di questa specie come il vino, i cibi fermentati e il materiale vegetale.

Alcuni studi hanno infatti dimostrato che ceppi di *L.plantarum* in condizioni di biofilm risultano più resistenti a alcool, acido acetico, pH acido, e ad agenti antimicrobici come ipoclorito di sodio e acidi organici (Kubota *et al.*, 2008; Kubota *et al.*, 2009). Questo meccanismo di difesa sembra essere mediato da modifiche a livello genetico che avvengono in cellule che si trovano in condizioni di biofilm. Infatti Kubota e colleghi (2009) hanno dimostrato che la diluizione

delle cellule di *L.plantarum* e il passaggio dallo stadio di biofilm allo stadio planktonico non influenza la loro resistenza agli agenti antimicrobici: quindi il meccanismo di tale aumentata resistenza non può essere spiegato solo con la protezione conferita dalla matrice esopolisaccaridica o dalla struttura tridimensionale del biofilm.

Grazie al recente sequenziamento del genoma del ceppo tipo *L.plantarum* WCFS1 (originariamente isolato dalla saliva umana) è stato possibile studiare i geni che possono essere coinvolti nei sistemi di regolazione di questo batterio e tra questi alcuni sono anche coinvolti nella formazione del biofilm. Nel genoma del ceppo WCFS1 sono stati individuati dei geni omologhi al sistema Agr di *S. aureus*, un operone che è coinvolto nella regolazione del biofilm e dell'adesione ed è anche regolato dal quorum sensing (Sturme *et al.*, 2007). In *L.plantarum* il locus „Agr-like“ produce un peptide tiolattone ciclico che controlla la morfologia cellulare, la struttura della colonia, l'adesione a superfici di vetro e la formazione del biofilm (Fujii *et al.*, 2008) come è schematizzato nella figura seguente.

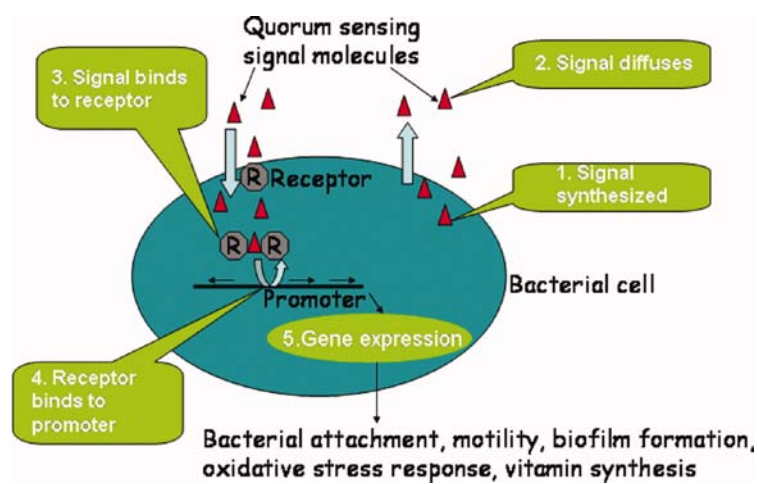


FIG.3.4 segnali molecolari nel pathway che porta alla formazione di biofilm in *L.plantarum*

3.1.4.2 Biofilm nei lieviti

I lieviti hanno una spiccata capacità di aderire a superfici abiotiche e non solo, ad esempio alcuni lieviti patogeni formano biofilm negli impianti sanitari come *Candida albicans* e *Candida glabrata*, e altre specie formano biofilm negli impianti industriali dove provocano contaminazione degli alimenti prodotti dall'impianto stesso (Verstrepen e Klis, 2006).

Il biofilm ha anche dei risvolti positivi, come nel caso dell'utilizzo dei lieviti nell'industria delle bevande fermentate come la birra e il vino, dove la formazione di aggregati facilita la separazione della biomassa dalla bevanda alla fine della fermentazione. In particolare i lieviti formano dei fiocchi (meccanismo detto di flocculazione) grazie alla adesione tra cellule (Verstrepen *et al.*, 2003).

L'adesione alla superficie impedisce alle cellule di essere dilavate quando si trovano in un ambiente ostile, la formazione del biofilm permette loro di resistere a condizioni esterne avverse. Nell'ambiente naturale infatti i microrganismi si trovano normalmente in comunità, diversamente da quanto accade in condizioni di laboratorio, dove esse vengono mantenuti in colture liquide in agitazione: è quindi logico pensare che i meccanismi che controllano lo sviluppo multicellulare siano diversi da quelli che regolano la crescita in colture di laboratorio. La formazione di comunità fornisce ulteriori capacità di proteggersi dall'ambiente esterno e offre la possibilità di usufruire dei vantaggi derivanti dal differenziamento cellulare (Palkova e Vachova, 2006).

Dell'adesione è responsabile una classe di proteine di parete dette adesine che hanno una caratteristica struttura formata da 3 domini: la parte C terminale contiene un GPI che le ancora alla parete, la parte N terminale contiene un sito di legame per carboidrati o peptidi che sporge dalla superficie cellulare, la parte centrale varia per permettere l'adattamento alle condizioni esterne. Infatti esistono molte forme di adesine, che variano da specie a specie, ad esempio la specie *Saccharomyces cerevisiae* possiede 5 geni della flocculazione (detti geni FLO) alcuni dei quali sono responsabili dell'adesione alle superfici come FLO11 mentre altri mediano l'aggregazione tra cellule (flocculazione) come FLO1-5-9.

I meccanismi di adesione nei lieviti si suddividono in adesione mediata da zuccheri e adesione indipendente da zuccheri: mentre il primo tipo dipende da legame delle adesine con residui carboidrati di altre cellule (geni FLO 1), il secondo invece è mediato dal legame delle adesine con peptidi o dalla loro interazione con superfici abiotiche come le adesine FLO11 in *S.cerevisiae* che permettono adesione di tipo idrofobico con superfici abiotiche.

I geni che mediano l'adesione non sono costitutivamente espressi ma vengono attivati da condizioni ambientali sfavorevoli per mancanza di nutrienti (azoto e/o carbonio) oppure cambiamenti in pH o contenuto di etanolo. Infatti il passaggio alla modalità di adesione permetterebbe ai lieviti di superare la situazione di stress ad esempio insediandosi in un ambiente nuovo ricco di nutrienti o proteggendosi

dall'esterno come negli aggregati, o nel caso di funghi patogeni, l'adesione sarebbe un meccanismo per colonizzare l'ospite.

L'attivazione dei geni FLO è mediata da una cascata di eventi che coinvolge anche diverse MAP chinasi (Verstrepen e Klis, 2006).

S.cerevisiae è uno dei lieviti più studiati ed utilizzato come modello per lo studio dei meccanismi di adesione a substrati biotici e abiotici, per la sua notevole capacità di formare biofilm e per la sua importanza tecnologica (Reynolds and Fink, 2001). In *S.cerevisiae* la formazione di biofilm e l'adesione a superfici di diversa natura come l'agar o la plastica, è mediata dalla flocculina FLO11 ed è inibito dal mannosio. Questo meccanismo di flocculazione è attivato ad alte concentrazioni cellulari e a pH acidi infatti avviene soprattutto in cellule in tarda fase esponenziale o in fase stazionaria (Bayly *et al.*, 2005).

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Curva di crescita

Allo scopo di indagare le caratteristiche di crescita dei ceppi selezionati, è stato messo a punto un metodo per stimare la curva di crescita in microtitre in mezzo ricco di mantenimento (MRS) e in mosto sintetico per mimare le condizioni enologiche di alta concentrazione zuccherina e basso pH.

Per la curva di crescita in MRS, le colture sono state preinoculate in MRS (Oxoid) al 1% da stock in glicerolo e dopo un'incubazione a 30°C in aerobiosi per 24 ore, è stato effettuato un inoculo di 10^6 cell/ml in ciascun pozzetto delle piastre microtitre. Per la curva di crescita in mosto sintetico invece è stato effettuato un preinoculo in MRS come descritto precedentemente, a cui è seguito un adattamento in MRS pH4 per 24 ore e infine un inoculo finale in mosto sintetico. Dopo 48 ore di incubazione a 30°C in aerobiosi, è stato effettuato un inoculo di 10^6 cell/ml in ciascun pozzetto delle piastre microtitre. Per analizzare le dinamiche di crescita l'assorbanza a 590nm è stata misurata a intervalli di 1 ora fino a 24 ore, utilizzando lo spettrofotometro Spectrafluor (Tecan).

3.2.2 Attività antimicrobica

I ceppi di *L.plantarum* selezionati sono stati sottoposti a uno screening della attività antimicrobica contro alcune specie batteriche maggiormente presenti in vinaccia all'inizio dello stoccaggio, allo scopo di valutare l'eventuale produzione di sostanze antimicrobiche contro questi microrganismi come meccanismo di instaurarsi della dominanza della specie *L.plantarum* nella microflora della vinaccia. In particolare è stata saggiato l'effetto del surnatante (spent medium) di colture di *L.plantarum* cresciute in MRS e in mosto sintetico, sulla crescita dei seguenti ceppi batteri acetici e lattici isolati da vinaccia naturale all'inizio dello stoccaggio: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Lactobacillus hilgardii*.

Nella prima serie di esperimenti i ceppi di *L.plantarum* sono stati inoculati in MRS e cresciuti a 30°C in aerobiosi per 24, nella seconda serie di esperimenti i ceppi sono stati inoculati in mosto sintetico a pH4 per 48 ore.

Il surnatante (spent medium) è stato ottenuto attraverso due centrifugazioni successive a 5500rpm x 10 minuti e 10000rpm x 10 minuti. Infine lo spent medium è stato neutralizzato portandolo a pH 6.5 con l'aggiunta di NaOH.

L'attività antimicrobica è stata valutata in microtitre seguendo il metodo proposto da Rojo-Bezares *et al.*, 2007(*microplate assay*): 30µl di spent medium sono stati aggiunti a ogni pozzetto contenente un inoculo pari a 10^6 cellule del microrganismo indicatore nell'apposito mezzo di coltura (YPM o MRS o mosto sintetico). Per le piastre microtitre relative agli esperimenti con il ceppo di *L.hilgardii* l'assorbanza a 590nm è stata letta in continuo con lo spettrofotometro Spectraflour ogni ora. Per gli esperimenti che utilizzavano i batteri acetici come indicatori, le piastre microtitre sono state incubate in agitazione a 30°C e a intervalli regolari è stata misurata l'assorbanza allo spettrofotometro Spectraflour . Lo stesso esperimento è stato ripetuto mediante il protocollo *agar well assay* che prevede l'inoculo dello spent medium in un pozzetto ricavato da una piastra Petri in cui è stato precedentemente versato l'apposito mezzo di coltura contenente un inoculo di 10^6 cellule del microrganismo indicatore. Come controllo positivo è stata utilizzata una soluzione di antibiotico

3.2.3 Produzione di biofilm

Il saggio per la formazione del biofilm si basa sul metodo che utilizza come sistema di rilevazione il colorante cristalvioletto messo a punto da O'Toole e Kolter, 1998. La capacità di formare biofilm viene valutata quantificando la biomassa legata in modo specifico e permanente al fondo del pozzetto di una piastra. Il cristalvioletto viene inizialmente assorbito dallo strato di biofilm e poi solubilizzato in modo da rilasciare il colorante in soluzione. L'assorbanza della soluzione ottenuta sarà proporzionale alla quantità di biofilm presente inizialmente sul fondo del pozzetto.

L'utilizzo delle piastre microtitre da 96 pozzetti semplifica notevolmente l'esecuzione del test e permette di analizzare molti campioni insieme e di confrontare diverse repliche tra loro per valutare la ripetibilità del metodo. Inoltre per eliminare i legami aspecifici, sono stati aggiunti degli step di lavaggio sia all'inizio del saggio che prima della lettura allo spettrofotometro.

In particolare 100µl di una coltura cellulare in fase stazionaria diluita a un OD pari a 1, sono stati inoculati nei pozzetti delle piastre microtitre. Nel caso degli esperimenti di co-coltura, sono stati inoculati 100ul per entrambe le colture testate.

Dopo 24 ore di incubazione a 30°C, necessarie per formare il biofilm sul fondo dei pozzetti, è stato rimosso il volume di liquido presente in ciascun pozzetto ed è stata effettuata una serie di 3 lavaggi con PBS. Successivamente è stato aggiunto il colorante cristalvioletto (0.1% concentrazione finale) e dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente sono stati effettuati altri 3 lavaggi con acqua distillata. Infine è stato aggiunto dell'etanolo 95% per solubilizzare il colorante assorbito dallo strato di biofilm presente sul fondo del pozzetto. Dopo 30 minuti di incubazione è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro Spectrofluor alla lunghezza d'onda di 590nm. I dati sono stati rielaborati calcolando il rapporto OD_{t24ore}/OD_{t0} in modo da normalizzare i risultati rispetto ai singoli valori di background registrati. Ogni campione è stato ripetuto almeno 2 volte in 2 esperimenti indipendenti in ciascuno dei quali è stata misurata l'assorbanza in triplicato.

3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i diversi ceppi appartenenti al gruppo *L. plantarum* isolati durante lo stoccaggio della vinaccia non trattata, sono stati sottoposti ad una caratterizzazione fisiologica basata su alcune delle proprietà più interessanti della specie: il biofilm e l'attività antimicrobica.

ISOLATO	SPECIE	CLUSTER rep-PCR	ISOLATO	SPECIE	CLUSTER rep-PCR
DSMZ 20174	<i>L.plantarum</i>	/	T30PCM21	<i>L.fabifermentans</i>	36
T0PCM14	<i>L.plantarum</i>	10	T30PCM25	<i>L.plantarum</i>	22
T0PCM21	<i>L.plantarum</i>	18	T30PCM29	<i>L.plantarum</i>	8
T0PCM22	<i>L.plantarum</i>	19	T30PCM30	<i>L.plantarum</i>	23
T0PCM32	<i>L.plantarum</i>	5	T30PCM31	<i>L.plantarum</i>	15
T0PCM37	<i>L.plantarum</i>	21	T30PCM33	<i>L.plantarum</i>	11
T0PCM46	<i>L.plantarum</i>	1	T120PCM03	<i>L.fabifermentans</i>	30
T0PCM48	<i>L.fabifermentans</i>	29	T120PCM04	<i>L.fabifermentans</i>	31
T0PCM49	<i>L.plantarum</i>	2	T120PCM06	<i>L.fabifermentans</i>	38
T30PCM01	<i>L.fabifermentans</i>	39	T120PCM09	<i>L.plantarum</i>	14
T30PCM02	<i>L.plantarum</i>	12	T120PCM10	<i>L.plantarum</i>	3
T30PCM05	<i>L.fabifermentans</i>	28	T120PCM12	<i>L.plantarum</i>	4
T30PCM06	<i>L.fabifermentans</i>	40	T120PCM16	<i>L.plantarum</i>	13
T30PCM07	<i>L.fabifermentans</i>	41	T120PCM17	<i>L.plantarum</i>	16
T30PCM08	<i>L.fabifermentans</i>	33	T120PCM19	<i>L.fabifermentans</i>	32
T30PCM09	<i>L.plantarum</i>	20	T120PCM30	<i>L.fabifermentans</i>	27
T30PCM13	<i>L.fabifermentans</i>	34	T120PCM35	<i>L.plantarum</i>	17
T30PCM16	<i>L.fabifermentans</i>	37	T120PCM36	<i>L.plantarum</i>	6
T30PCM17	<i>L.plantarum</i>	9	T120PCM39	<i>L.fabifermentans</i>	35
T30PCM18	<i>L.plantarum</i>	7	T120PCM41	<i>L.plantarum</i>	24

TAB 3.1 Elenco dei ceppi appartenenti al gruppo *L.plantarum* scelti per la caratterizzazione fisiologica, con l'indicazione del cluster di appartenenza secondo l'analisi rep-PCR.

Come è indicato in tabella 3.1, è stato scelto un membro per ciascun cluster individuato dall'analisi genetica, e per questi ceppi è stata saggiata l'attività antimicrobica e la capacità di formare biofilm.

Queste caratteristiche potrebbero conferire alla specie *L.plantarum* la capacità di prevalere sulle altre specie batteriche, spiegando così la sua dominanza sulla microflora in vinaccia a tempi medio-lunghi di insilamento. La produzione di sostanze antimicrobiche potrebbe permettere alla specie *L.plantarum* di eliminare le altre specie batteriche che sono presenti in vinaccia e che competono per i nutrienti soprattutto i batteri lattici e acetici.

La capacità di formare biofilm renderebbe possibile la crescita sull'abbondante superficie costituita dalla buccia d'uva (principale componente della vinaccia) fornendo un ulteriore vantaggio adattativo.

Poiché la composizione della popolazione batterica della vinaccia influenza notevolmente la qualità del prodotto finito a causa della produzione di composti volatili che a fine distillazione compongono la grappa, la comprensione delle dinamiche con cui una specie domina la microflora sono di grande rilevanza anche sotto l'aspetto tecnologico.

3.3.1 Andamento della curva di crescita

Per poter conoscere le dinamiche di sviluppo in situazione di laboratorio degli isolati scelti del gruppo *L.plantarum* e poter progettare i successivi esperimenti, è stato necessario allestire un esperimento preliminare con lo scopo di ottenere per ciascun ceppo la relativa curva di crescita.

A tale scopo è stata misurata la assorbanza a 590nm per 24 ore in una microtitre, per i ceppi selezionati. In tabella 3.2 sono riportate le percentuali relative al numero di ceppi che hanno dimostrato una crescita veloce (classe 1), intermedia (classe 2) e lenta (classe 3).

classe	1	2	3
ODmax	OD>1,8	1,6<OD>1,8	OD<1,6
fase stazionaria	12-14h	16h	20h
% ceppi sul totale	87,5%	10,0%	2,5%

TAB 3.2 Percentuale di ceppi che appartengono alle 3 categorie individuate.

1=crescita veloce, 2=crescita intermedia, 3=crescita lenta.

Dal grafico in figura 3.5 possiamo osservare che le curve di crescita dei ceppi sono in gran parte sovrapponibili tra di loro, infatti la maggior parte dei ceppi, compreso il ceppo tipo, raggiunge la fase stazionaria dopo 12-14 ore di crescita con valori di OD massimo compresi tra 1,8 e 2,2. Si differenziano dalla media il ceppo T120PCM04 che raggiunge prima la fase stazionaria ma si attesta su valori di OD minori rispetto agli altri ceppi (crescita bassa). Altri 4 ceppi (T120PCM30

e 06, T30PCM01 e 16), invece risultano essere più lenti degli altri infatti raggiungono la fase stazionaria solo dopo 16-18 ore.

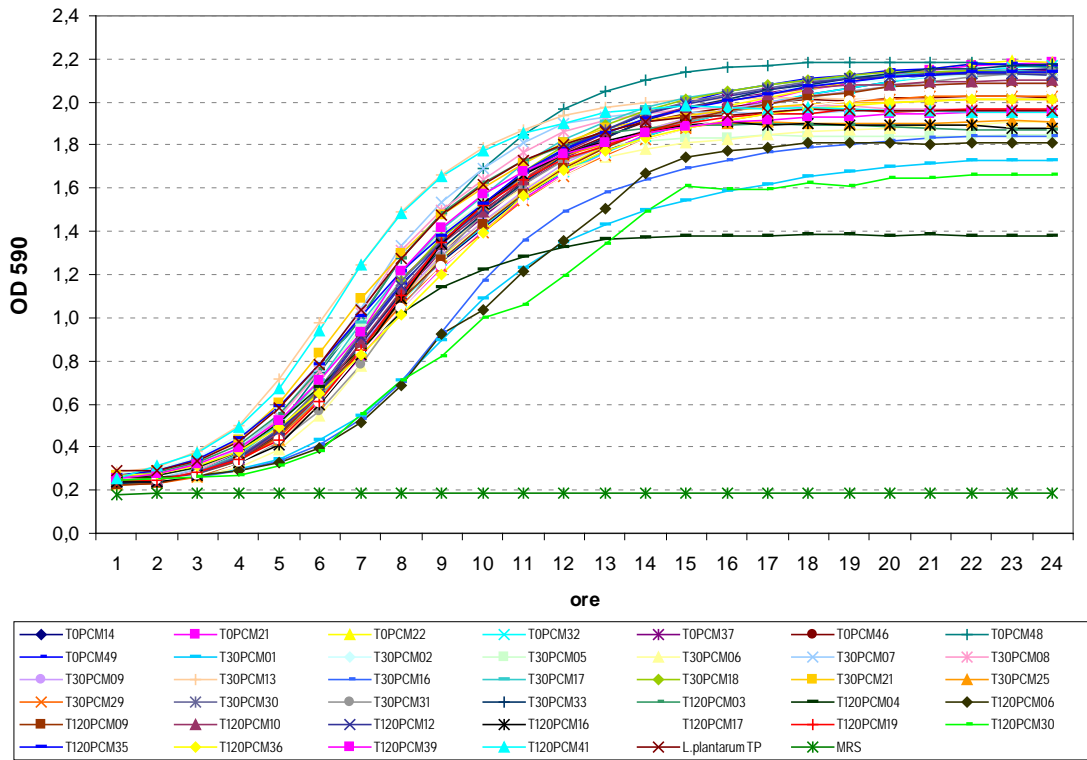


FIG 3.5 Curva di crescita dei ceppi scelti appartenenti al gruppo *L. plantarum*

Nel mezzo costituito da mosto sintetico (dati non riportati) la crescita dei ceppi di *L.plantarum* è risultata molto diversa, infatti la fase stazionaria viene raggiunta in media dopo 48 ore e il valore di OD ottenuto al picco è sensibilmente inferiore rispetto al valore riscontrato nel caso della crescita in MRS. Questo indica che il mosto sintetico rappresenta un mezzo di coltura poco idoneo alla crescita della specie *L.plantarum* a causa del valore di pH del mezzo e l'elevata concentrazione di zuccheri.

Per tutti i ceppi selezionati è stato anche misurato il pH che ha raggiunto il mezzo di coltura (MRS) dopo 24 ore di crescita. In tutti i casi la crescita dei microrganismi ha portato ad una acidificazione del mezzo il cui pH è passato da 6 ad un valore un minimo di 3,5 e massimo di 4,6.

In figura 3.6 sono riportate le percentuali relative al numero di ceppi che hanno determinato valori di pH finale compresi nei seguenti intervalli: 3,5-4 nel quale sono stati inseriti i ceppi con le migliori capacità di acidificazione, 4-4,5 ceppi con capacità intermedie e oltre 4,5 batteri scarsamente acidificanti. E' possibile quindi

affermare che l'80% dei ceppi ha buone capacità di acidificazione del mezzo, avendo ridotto il pH di almeno 2 punti.

Mediamente si può constatare che i ceppi dotati di buona velocità di crescita hanno anche una buona capacità di acidificazione del mezzo di coltura, infatti il ceppo che ha portato alla migliore acidificazione è stato il T30PCM02 (valore pH 1,73) che è risultato uno dei più veloci a crescere con un valore di OD finale di 2,12. Al contrario il peggiore nell'acidificazione è il ceppo T30PCM01 (pH 4,6) che ha raggiunto un valore massimo di OD pari a 1,73 rientrando nella classe dei ceppi con crescita lenta.

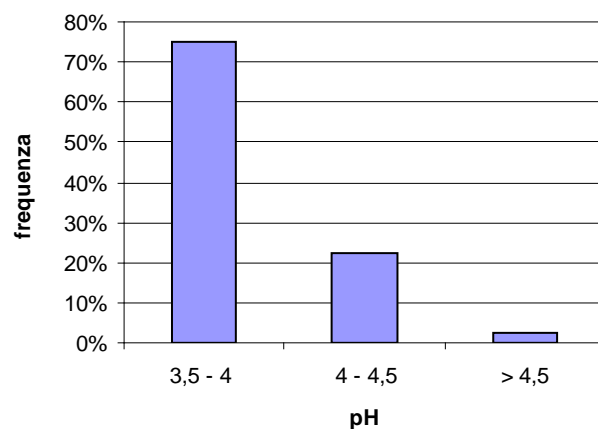


FIG 3.6 Frequenza dei ceppi che sono risultati buoni acidificatori, medi o scarsi.

3.3.2 Determinazione dell'attività antimicrobica

La capacità di produrre composti con azione antimicrobica potrebbe essere una delle strategie evolutive alla base della dominanza di *L.plantarum*. Per testare la capacità di produrre batteriocine da parte dei ceppi da vinaccia, è stato testato l'effetto del supernatante ottenuto dalle colture di ciascuno dei 40 ceppi selezionati, sulla crescita dei seguenti indicatori: *Acetobacter sp.* (ceppo T0PCP14), *Gluconobacter oxydans* (ceppo T0PCP27) entrambi Gram negativi e *Lactobacillus hilgardii* (ceppo T120PCM20) Gram positivi. Questi ceppi sono stati scelti tra quelli isolati dalla vinaccia analizzata perché sono maggiormente presenti all'inizio del periodo di stoccaggio come i due batteri acetici, o perché, come nel caso di *L. hilgardii* è la specie più presente dopo *L. plantarum* alla fine dello stoccaggio. La rilevazione di attività antimicrobica contro i batteri acetici potrebbe concorrere a spiegare il motivo per cui essi non

sono presenti durante lo stoccaggio della vinaccia, infatti dall'analisi microbiologica condotta precedentemente, è stato osservato che i batteri acetici si ritrovano solo al tempo T0.

Mentre un'azione antimicrobica di *L. plantarum* contro *L. hilgardii* potrebbe spiegare la sua sporadica presenza all'inizio dell'insilamento della vinaccia e la sua ricomparsa alla fine.

Entrambi i tipi di microrganismi usati come indicatori sono batteri particolarmente temuti: batteri acetici in quanto una loro contaminazione determina la produzione di elevate concentrazioni di acido acetico, *L. hilgardii* per la produzione di amine biogene e altri composti organoletticamente sgradevoli. Per questi motivi una eventuale azione antimicrobica sviluppata dai ceppi di *L. plantarum* costituirebbe un'interessante proprietà tecnologica, utile per l'eliminazione dalle vinacce di batteri indesiderati.

Sono state utilizzate per questo test colture dei diversi ceppi appartenenti al gruppo *L. plantarum* cresciute in MRS o in mosto sintetico per verificare l'influenza delle condizioni di crescita del ceppo sulla eventuale produzione di composti antimicrobici.

Per poter scegliere le tempistiche sperimentali, è stata effettuata una prima curva di crescita per ciascun microrganismo indicatore. Sulla base dei dati ottenuti è stata definita la durata dell'incubazione, l'inoculo iniziale e le condizioni di crescita relativamente a temperatura e mezzo di coltura.

Nell'esperimento con *Acetobacter*, pur non essendoci chiari effetti antimicrobici, alcuni surnatanti prodotti dai ceppi di *L. plantarum* hanno dimostrato una certa influenza sullo sviluppo dell'indicatore: il ceppo T120PCM12 ha provocato un considerevole calo dell'OD dopo 12 ore di incubazione, mentre i ceppi T30PCM17, T120PCM19, T120PCM16, T120PCM41 hanno provocato, sempre dopo 12 ore, un calo più contenuto. Questo effetto però non sembra riconducibile all'azione di una batteriocina che normalmente agisce bloccando la crescita dell'indicatore durante la fase di latenza ed esponenziale, sembrerebbe invece collegato con un aumento del processo di lisi cellulare dei batteri in fase stazionaria indotto dal surnatante. In figura 3.7 sono riportate le percentuali relative al numero di ceppi che hanno prodotto valori OD dopo 12 ore compresi nei seguenti intervalli: 0,4-0,6 nel quale sono stati inseriti i ceppi che sono caratterizzati dai valori più bassi, 0,6-0,8 quelli con valori intermedi, 0,8-1 quelli con un comportamento molto simile al controllo (OD 0,9), 1 e 1,2 i ceppi che con

valori di OD superiori al controllo non trattato. Il 40% dei ceppi di *L.plantarum* non ha sostanzialmente modificato l'andamento della crescita dell'indicatore *Acetobacter* rispetto al controllo e cioè la coltura non inoculata con il supernatante. Il 22,5% dei ceppi ha provocato una riduzione della densità ottica media o intensa, e il 37,5% ha al contrario portato a un leggero aumento della crescita (OD finale superiore a 1)

Per quanto riguarda *Gluconobacter*, il 67,5% dei ceppi di *L. plantarum* non ha modificato l'andamento della crescita rispetto al controllo non trattato che ha raggiunto un'OD massima di 1,13. Il 32,5% invece ha provocato una lieve o media diminuzione della densità ottica.

Dai risultati ottenuti è possibile affermare che i ceppi testati non producano batteriocine attive contro i batteri acetici, come è spesso descritto in letteratura in cui diversi studi indicano le plantaricine come batteriocine attive contro i batteri Gram positivi.

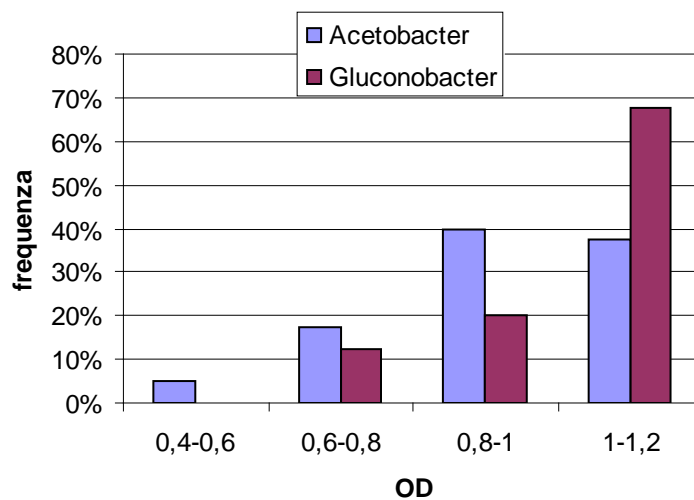


FIG 3.7 Capacità del surnatante colturale prodotto dai ceppi di *L plantarum* di inibire lo sviluppo dei ceppi indicatori *Gluconobacter oxydans* (ceppo T0PCP27) e *Lactobacillus hilgardii* (ceppo T120PCM20)

L'attività antimicrobica dei supernatanti di *L.plantarum* è stata saggiata anche nei confronti della specie *L.hilgardii*, batterio Gram positivo.

In figura 3.8 sono riportati i risultati della crescita del ceppo indicatori di *L. hilgardii* T120PCM20 in presenza del surnatante prodotto dai dieci ceppi scelti di *L. plantarum*.

Risulta evidente che nessun ceppo di *L.plantarum* ha dimostrato alcun effetto d'inibizione della crescita del ceppo indicatore, infatti tutte le curve di crescita sono esattamente sovrapponibili a quella del controllo non trattato.

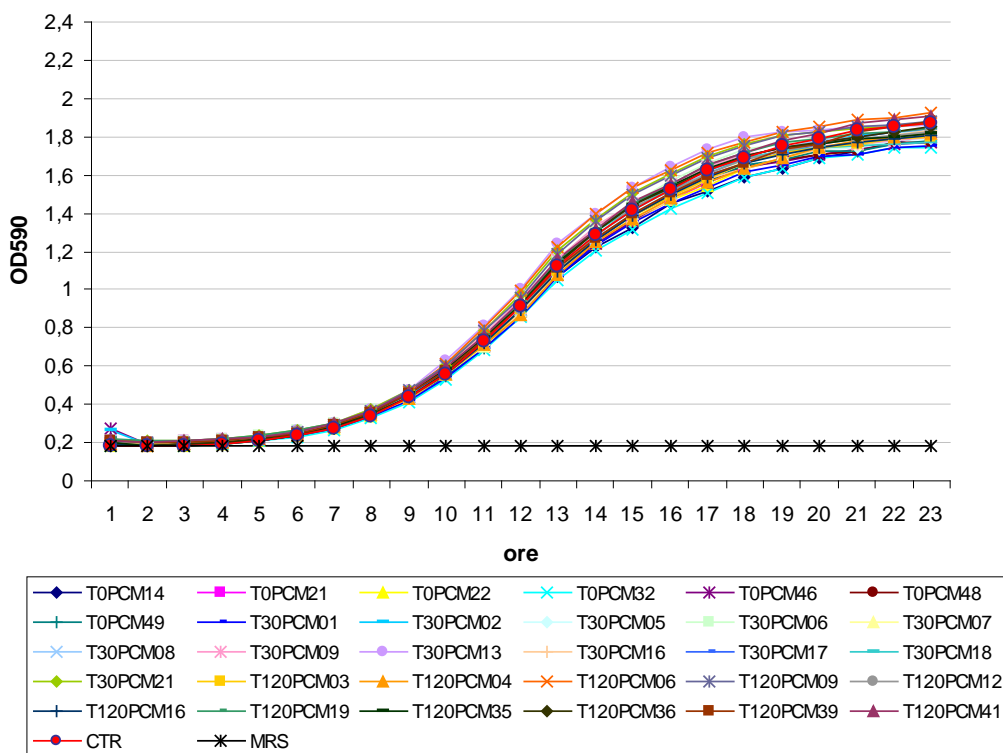


FIG 3.8 Andamento della curva di crescita di *L.hilgardii* in presenza dei supernatanti derivanti da colture di diversi ceppi di *L.plantarum*

In conclusione nessuno dei ceppi di *L. plantarum* isolati da vinaccia e testati in questi esperimenti ha dimostrato la capacità di inibire in modo rilevante la crescita di altri ceppi tipici della microflora delle vinacce.

Questi risultati potrebbero essere dovuti al fatto che nessuno dei ceppi è geneticamente in grado di produrre batteriocine oppure le condizioni sperimentali usate non sono idonee alla produzione di batteriocine.

In relazione a quest'ultima affermazione, data la complessità strutturale del locus *pln* che codifica per le plantaricine (Diep *et al.*, 2009), il meccanismo di attivazione del sistema è dipendente da moltissimi parametri e fattori esogeni ed endogeni., come illustrato nella parte introduttiva.

Molti esempi sono presenti in letteratura di ceppi che pur possedendo le informazioni genetiche per la sintesi delle batteriocine, non attivano la loro sintesi o la attivano solo in presenza di un altro organismo (meccanismo di induzione) oppure in determinate condizioni di pH o ancora in una fase precisa del ciclo cellulare. Infatti molti parametri influenzano l'attività antimicrobica e in particolare la produzione e l'efficacia delle batteriocine: il mezzo di coltura, il microrganismo indicatore, la concentrazione cellulare relativa.

Anche la fase di crescita influenza la produzione di batteriocine in quanto nella maggior parte dei casi la maggior produzione si ha quando la cellula raggiunge la fase stazionaria (Rojo-Besarez *et al.*, 2007).

In letteratura vi sono alcune indicazioni relative all'inducibilità della produzione: in questi sistemi non si ha attività antimicrobica rilevabile da parte del produttore, in monocultura ma solo in co-cultura con un induttore che potrebbe essere anche indicatore. Ciò è stato dimostrato per la batteriocina C11 (Diep *et al.*, 1995), NC8 (Maldonado *et al.*, 2004).

In altri sistemi sembra necessario un contatto tra il batterio indicatore e *L. plantarum* per avere una stimolazione della produzione di batteriocine. In questi casi infatti solo il test in piastra ha rilevato attività antimicrobica mentre con il test in coltura liquida non c'è stata produzione per la mancanza di contatto prolungato cellulare tra induttore e produttore (Rojo-Besarez *et al.*, 2007).

Per questa ragione le prove antimicrobiche sono state ripetute utilizzando il test di diffusione in agar, in cui l'effetto viene valutato sulla base della presenza di un alone di inibizione del ceppo indicatore presente su tutta la piastra, che si presenta nell'area in cui è stata posta una opportuna aliquota di surnatante del produttore.

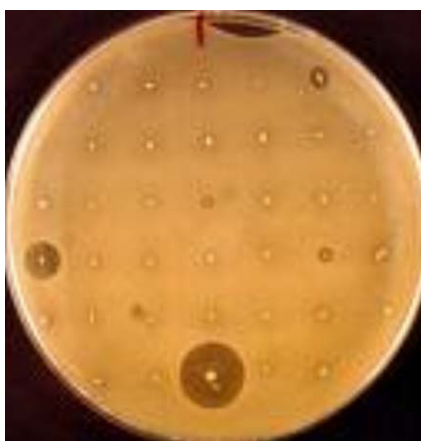


FIG 3.9 Esempio di test microbico su piastra

Come si vede dall'esempio riportato in figura 3.9, questo test non ha evidenziato un'inibizione della crescita dei microrganismi indicatori. Infatti non si notano aloni di inibizione tranne dove è stata versata una soluzione contenente antibiotico come controllo positivo.

Possiamo quindi concludere che nelle nostre condizioni sperimentali nessun ceppo di *L. plantarum* ha la capacità di produrre batteriocine attive contro i microrganismi indicatori testati.

Ulteriori esperimenti sarebbero necessari per testare altre condizioni sperimentali, ad esempio saggiando l'effetto di uno surnatante ottenuto da co-culture di *L. plantarum* con un'altra specie che possa agire da induttore.

3.3.3 Formazione di biofilm da parte di isolati di *L.plantarum*

Per determinare la capacità di formare biofilm della popolazione di *L.plantarum* isolata da vinacce di prosecco, i 40 ceppi scelti in base alla caratterizzazione genetica (elencati in tabella 3.1), sono stati sottoposti al test di produzione di biofilm come descritto nel paragrafo 3.2.3 del capitolo "Materiali e metodi".

Questa metodica, che prevede l'utilizzo di microtitre per la crescita microbica e la colorazione con cristalvioletto per la quantificazione del biofilm prodotto, è stata spesso utilizzata per la valutazione della formazione di biofilm in molti microrganismi (O'Toole *et. al*, 1999) in quanto oltre ad essere veloce e di semplice esecuzione, è affidabile e permette una quantificazione della biomassa che compone il biofilm. Il test prevede anche dei passaggi di lavaggio che permettono l'eliminazione della biomassa legata in modo aspecifico al fondo del pozzetto, permettendo di rilevare solo ciò che viene propriamente considerato come biofilm. In figura 3.10 è riportata un'immagine di una piastra microtitre dopo il test del cristalvioletto: i pozzetti maggiormente colorati sono quelli in cui si era formato un maggiore strato di biofilm.

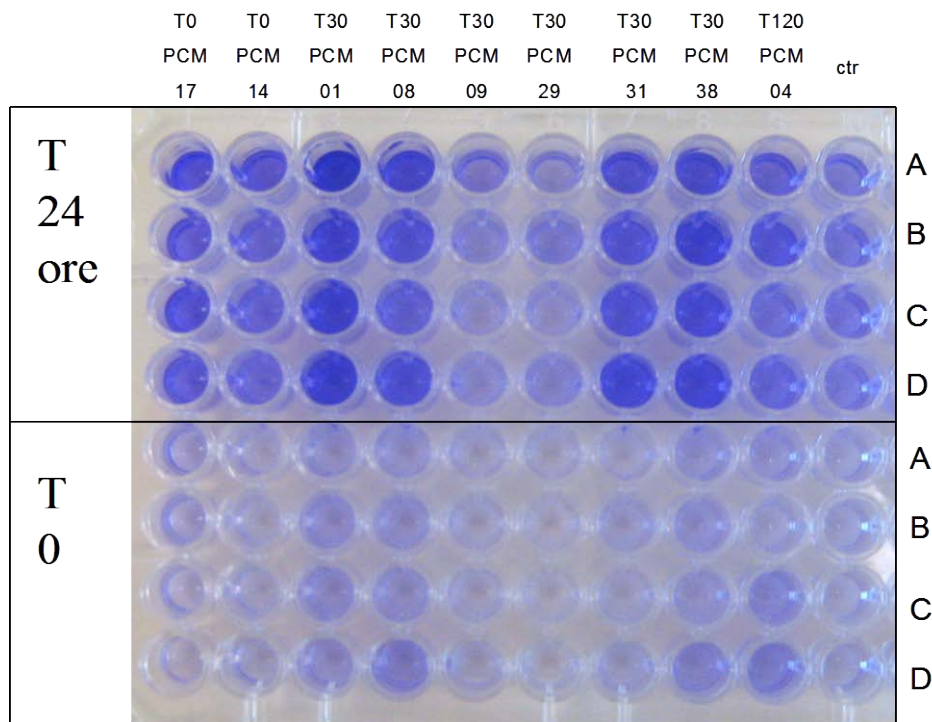


FIG 3.10 Valutazione della produzione di biofilm mediante crescita dei microrganismi in microtitre e colorazione del biofilm prodotto con cristalvioletto. In alto sono indicati i ceppi analizzati e per ciascuno le 4 repliche (A,B,C,D). E' riportato la situazione prima dell'incubazione (T0) e dopo 24 ore (T24).

Nella prima fase della sperimentazione si è proceduto alla messa a punto del metodo, allo scopo di trovare (a) le condizioni ottimali di lavaggio per eliminare il background, (b) il miglior agente solubilizzante che permetta di rilasciare la maggior quantità di cristalvioletto, (c) il tempo di incubazione necessario per poter rilevare la massima produzione di biofilm. Esperimenti preliminari in MRS condotti a 4-24-48 ore hanno evidenziato che dopo 24 ore si ottiene la massima quantità di biofilm (4 ore non sono sufficienti, a 48 ore è già iniziato il distacco della biomassa, fase di invecchiamento del biofilm).

Per valutare l'effetto del mezzo di coltura, sono stati effettuati in parallelo rilevazioni utilizzando MRS e mosto sintetico come mezzo di crescita. In particolare quest'ultimo è stato scelto per riprodurre condizioni presenti nella vinaccia per quanto riguarda la concentrazione di zuccheri e pH.

I dati sono stati presentati sotto forma di rapporto tra l'assorbanza misurata a 24 ore e quella misurata all'inizio dell'incubazione (rapporto OD t24/t0): in questo

modo la produzione di biofilm viene valutata con un valore che risulta multiplo di quello registrato al tempo iniziale e quindi diventa facilmente confrontabile con quelli ottenuti nella stessa sperimentazione o in sperimentazioni precedenti. I dati relativi alla produzione di biofilm in MRS e mosto sintetico sono riportati nella figura seguente.

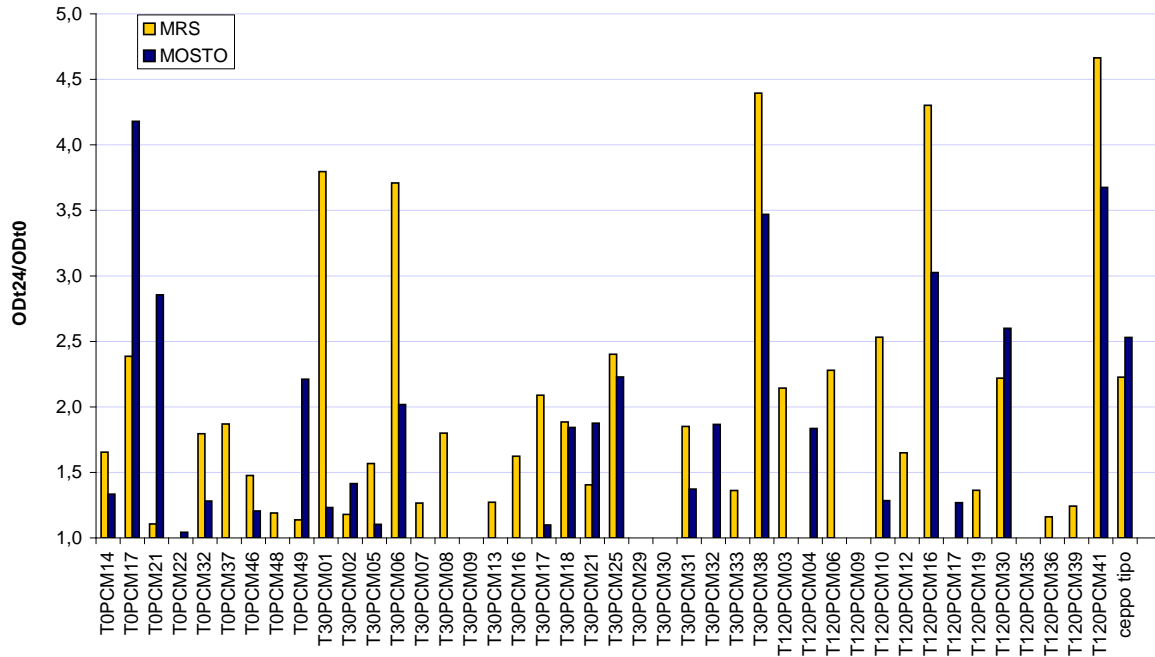


FIG 3.11 Produzione di biofilm da parte dei ceppi di *L.plantarum* isolati a diversi tempi di campionamento

Considerando che il valore di rapporto OD t24/t0 del mezzo di coltura è pari a 1, possiamo considerare questo valore come soglia, quindi i ceppi che hanno un rapporto pari o superiore a questo valore possono essere considerati produttori. Nella tabella seguente sono riportate i valori percentuali calcolate sulla base del numero dei ceppi produttori e non produttori nei due mezzi di coltura, suddivise a seconda del tempo di campionamento di provenienza (0,30,120 giorni).

MRS	T0	T30	T120	tot
non produttori	11%	21%	27%	21%
produttori	89%	79%	67%	79%
mosto	T0	T30	T120	tot
non produttori	22%	42%	57%	43%
produttori	78%	58%	43%	57%

TAB 3.4 Percentuale dei produttori e non produttori di biofilm in MRS e in mosto sintetico isolati ai diversi tempi di campionamento. .

Nel test effettuato in MRS, una gran parte dei ceppi possono essere considerati produttori, indipendentemente dal tempo di campionamento dal quale sono stati isolati. Anche in mosto la maggioranza dei ceppi sono risultati produttori di biofilm, soprattutto all'inizio dello stoccaggio della vinaccia e dopo 30 giorni di insilamento. Questo indica che tra i ceppi presenti in vinaccia all'inizio dello stoccaggio e provenienti dalla superficie dell'uva, molti sono in grado di formare biofilm e successivamente questi ceppi vengono selezionati e infatti questa proprietà si ritrova largamente nella popolazione microbica durante l'insilamento. Questo avvalorava l'ipotesi che la capacità di formare biofilm fornisca un vantaggio evolutivo per i ceppi presenti in vinaccia, perché i ceppi batterici che riescono a crescere adesi alla superficie dell'acino riescono a trovare nutrimento e sono meno esposti alle condizioni stressanti dell'ambiente vinaccia (pH basso, alta concentrazione di zucchero, ossigeno).

I ceppi migliori produttori con un valore di OD t_{24}/t_0 superiore a 3, in MRS sono risultati T30PCM01, T30PCM05, T30PCM38, T120PCM16 e T120PCM41. In mosto gli ultimi 3 ceppi sono ottimi produttori ai quali si deve aggiungere T0PCM17.

Il ceppo tipo della specie *L.plantarum* si è rivelato produttore di biofilm sia in mosto che in MRS ma molti isolati naturali hanno dimostrato capacità superiori di formare biofilm, confermando l'ipotesi che indipendentemente da questa capacità propria del gruppo *L.plantarum*, la maggiore o minore espressione di essa dipende dalle condizioni naturali in cui si trova il singolo ceppo.

Gli isolati utilizzati nell'indagine sono stati scelti sulla base dell'analisi genetica mediante repPCR. E' stato considerato un rappresentante per ceppo. Nella maggior parte dei casi il ceppo è presente solo in uno dei momenti di

campionamento (T0, T30, T120). Fanno eccezione i ceppi definiti dai *cluster* 10, 13, 24 che contengono rispettivamente isolati al tempo T0 e T30, T30 e T120, T0 e T120. Con lo scopo di valutare l'effetto dell'ambiente vinaccia sulle caratteristiche fisiologiche del microrganismo, sono stati aggiunti altri 3 isolati appartenenti ai suddetti *cluster* e quindi precisamente T30PCM38, T30PCM32 e T0PCM17 (in figura 3.12 sono indicati con una freccia) che possono essere considerati geneticamente identici agli individui già scelti e quindi appartenenti ciascuno ai ceppi corrispondenti.

Per quanto riguarda il *cluster* 10, il ceppo T0PCM14 è un debole produttore mentre il suo clone T30PCM38 è un ottimo produttore con valori di OD t24/t0 tra i più alti ottenuti nell'analisi. Nel *cluster* 13 abbiamo il ceppo T30PCM32 che risulta produttore solo in mosto, e T120PCM16 che è un ottimo produttore, con valori OD t24/t0 superiori a 4. Per il *cluster* 24 il ceppo T0PCM17 risulta un ottimo produttore soltanto in mosto mentre il T120PCM41 è il ceppo migliore per la produzione di biofilm in quanto i valori di OD t24/t0 sono superiori a 3,5 e 4,5 rispettivamente in mosto e MRS.

I risultati indicano quindi che nonostante l'ambiente vinaccia non sembri selezionare solo i ceppi produttori, ma al contrario favorisca un forte turnover di popolazioni batteriche, i pochi ceppi che riescono a permanere per tempi prolungati sono "stimolati" in qualche modo nella loro capacità di formare biofilm.

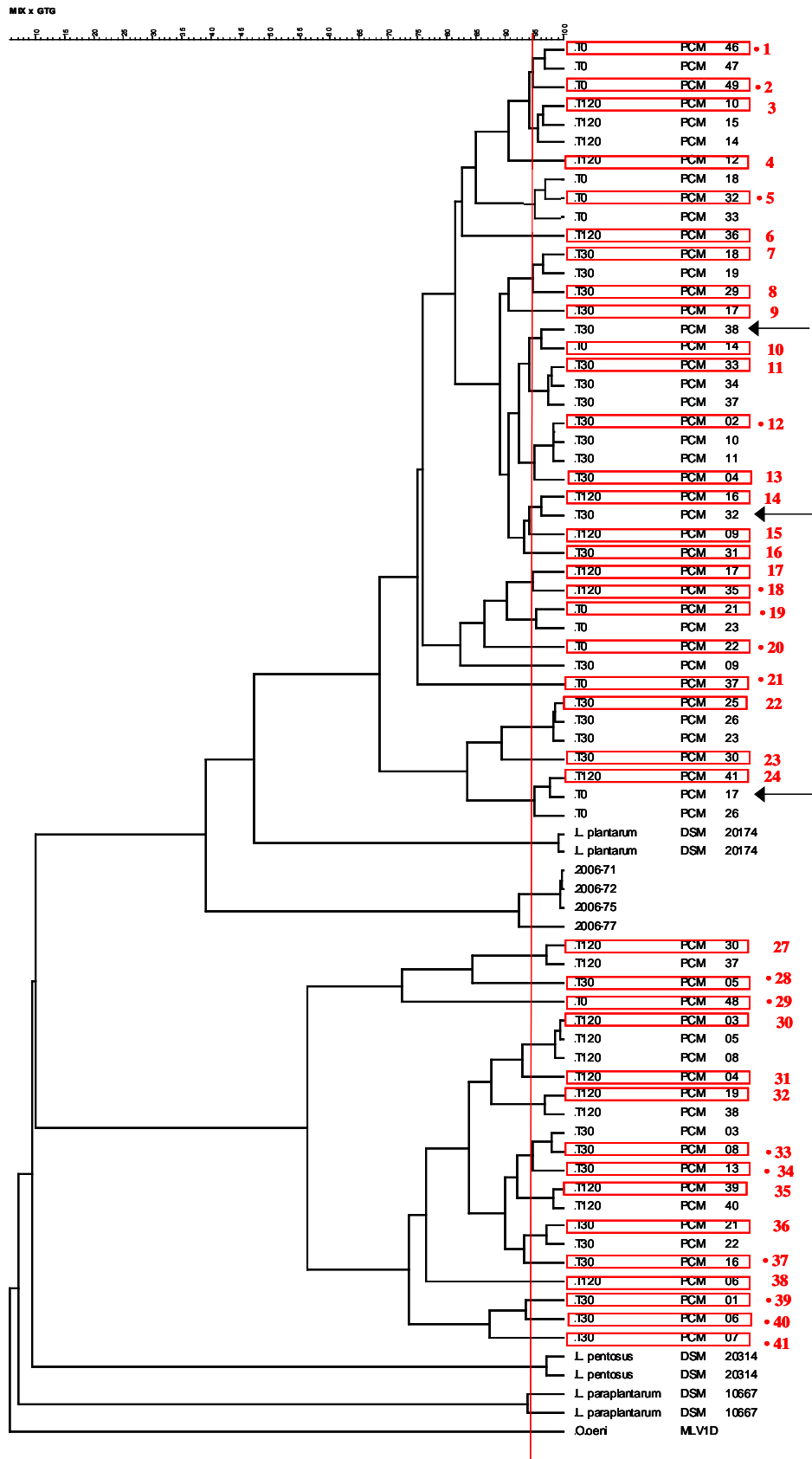


FIG 3.12 Dendrogramma ottenuto dall'analisi dei profili rep-PCR. Sono evidenziati i ceppi analizzati per la produzione del biofilm ed indicato il cluster corrispondente. Sono indicati con un pallino i ceppi risultati produttori di biofilm, con la freccia i 3 isolati aggiunti all'analisi.

3.3.4 Formazione di biofilm da parte di isolati di *S.cerevisiae*

Come già evidenziato per le specie batteriche, anche per i lieviti, nell'ambiente vinaccia, la capacità di formare biofilm sulla buccia potrebbe rappresentare un vantaggio evolutivo. Quindi è stata saggiata la capacità di produrre biofilm con la stessa metodica usata per i batteri, da parte alcuni ceppi di *S. cerevisiae*.

In particolare sono stati scelti 4 ceppi isolati da vinaccia di prosecco (AR1, AR3, NR8, NR14) e 2 isolati da mosto di Prosecco (P304.13 e P225.5 e precedentemente caratterizzati dal punto di vista tecnologico. Tutti i ceppi sono dotati di buone proprietà enologiche in termini di capacità fermentative e produzione di composti aromatici (dati non riportati in questa tesi)

Per i lieviti la quantificazione del biofilm è avvenuta dopo 1 o 4 ore di incubazione in quanto è noto che in questo caso la formazione del biofilm è molto più veloce rispetto a quanto si verifica nei batteri (Reynolds and Fink, 2001; O'Toole *et al.*, 1999).

Il grafico seguente illustra i risultati ottenuti per i 6 ceppi di lievito, in condizioni di laboratorio (mezzo di coltura YPD) e in condizioni che simulano l'ambiente enologico (mosto sintetico). Tutti i ceppi tranne AR3 hanno un andamento simile nelle due condizioni analizzate. Tutti, ad eccezione di AR1, sono risultati ottimi produttori e il migliore è risultato il ceppo NR8. Il picco massimo ottenuto è confrontabile con il valore massimo ottenuto dal migliore ceppo tra quelli saggiati di *L. plantarum*.

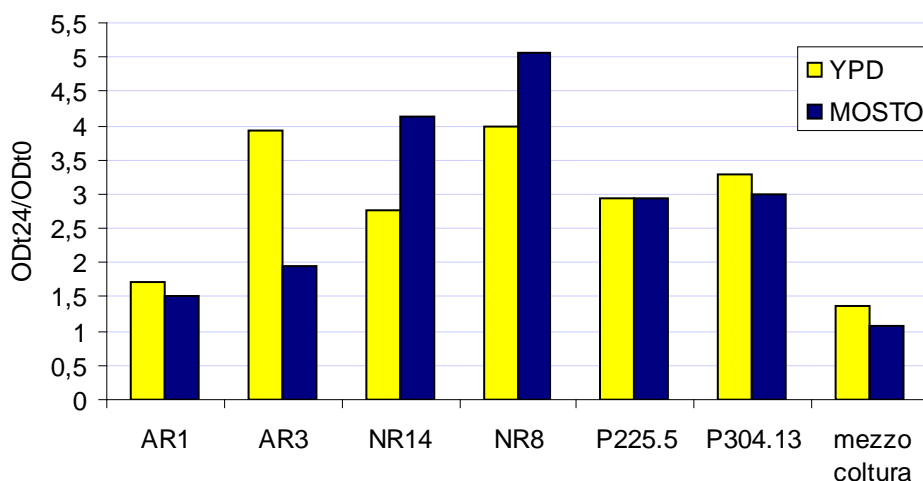


FIG 3.13 Produzione biofilm da parte di ceppi di origine enologica appartenenti alla specie *S. cerevisiae*

3.3.5 Formazione di biofilm in colture contenenti combinazioni di ceppi di *L.plantarum* e ceppi di *S.cerevisiae*

Nel caso della vinaccia vergine, al momento della sua separazione dal mosto, come già dimostrato nel capitolo precedente, si osserva il predominare della popolazione costituita da lieviti rispetto ai batteri. In particolare nel caso sperimentale analizzato al momento della produzione della vinaccia dopo la torchiatura i lieviti sono 10 volte più numerosi dei batteri.

Successivamente la concentrazione batterica supera quella dei lieviti di circa 100 volte, come dimostrato dal campionamento a 30 giorni, e a lungo termine (campionamenti seguenti) rimane sempre più numerosa. Per questo motivo è stato scelto di approfondire lo studio dei biofilm utilizzando sistemi costituiti da lieviti e batteri in co-coltura. Il particolare è stato preferito un rapporto tra batteri e lieviti pari a 10:1. Questa combinazione è stata scelta perché riproduce la situazione che si verifica nella vinaccia durante la maggior parte del periodo di stoccaggio(dopo 30 giorni), inoltre tiene in considerazione le dimensioni cellulari dei due gruppi microbici. Generalmente un lievito è circa 10 volte più grande di un batterio.

Sono stati utilizzati 9 ceppi del gruppo *L.plantarum* scelti tra quelli che nei saggi di biofilm in monocoltura erano risultati non produttori, buoni produttori e ottimi produttori. Per i lieviti sono stati utilizzati i 4 ceppi di *S. cerevisiae* isolati da vinaccia e precedentemente testati per il biofilm in monocoltura (Tab. 3.5). Nella tabella seguente sono elencati i ceppi utilizzati in questa analisi del biofilm multi specie.

batteri	biofilm MRS	biofilm mosto
T0PCM14	<i>non produttore</i>	<i>non produttore</i>
T30PCM07	<i>discreto</i>	<i>non produttore</i>
T30PCM32	<i>non produttore</i>	<i>discreto</i>
T0PCM17	<i>discreto</i>	<i>ottimo</i>
T0PCM49	<i>discreto</i>	<i>discreto</i>
T30PCM01	<i>discreto</i>	<i>discreto</i>
T30PCM38	<i>ottimo</i>	<i>ottimo</i>
T120PCM16	<i>ottimo</i>	<i>ottimo</i>
T120PCM41	<i>ottimo</i>	<i>ottimo</i>

lieviti	biofilm YPD	biofilm mosto
AR1	<i>discreto</i>	<i>discreto</i>
AR3	<i>ottimo</i>	<i>discreto</i>
NR8	<i>ottimo</i>	<i>ottimo</i>
NR14	<i>discreto</i>	<i>ottimo</i>

TAB 3.5 Ceppi di batteri e lieviti scelti per i test del biofilm multispecie

Dati ottenuti da esperimenti preliminari dimostrano che nelle co-culture così composte non si hanno effetti di inibizione della crescita e sia lievito che batterio raggiungono la fase stazionaria con le stesse modalità di quanto osservato nelle singole colture. Per questi esperimenti in co-cultura sono stati utilizzati il mosto sintetico e il mezzo YPD che garantisce un'ottima crescita di lieviti e batteri e per questi ultimi il livello di biofilm ottenuto è comparabile con quello ottenuto in MRS a 24 ore di incubazione.

Osservazioni al microscopio ottico confermano che il biofilm prodotto è costituito da entrambe le specie: in figura 3.14 i lieviti sono colorati in viola scuro e sono di dimensioni molto maggiori rispetto ai batteri che sono colorati di rosa e hanno forma a bastoncino. Queste immagini sono state ottenute dalla colorazione del biofilm formato sul fondo di una piastra petri dopo incubazione per 24 ore con un mix di colture di *L.plantarum* e *S.cerevisiae* in proporzione 90-10%. Il biofilm formato sul fondo della piastra è stato sottoposto alla stessa colorazione con cristalvioletto su cui si basa il test in microtitre.

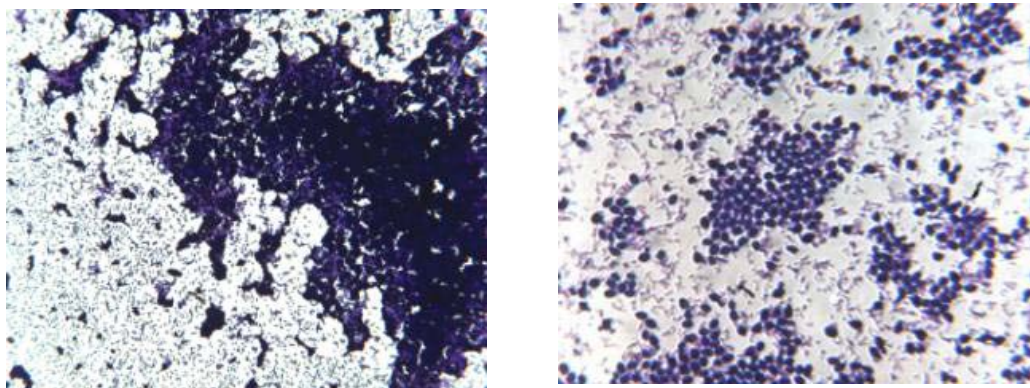


FIG 3.14 Immagini al microscopio ottico (10X a sinistra, 40x a destra) di un biofilm dopo colorazione con cristalvioletto.

I risultati dei test di biofilm multi specie sono riassunti nella tabella seguente, dove sono indicati i valori del rapporto OD t24/t0 ottenuti in ciascuna combinazione costituita da un ceppo appartenente al gruppo *L.plantarum* e uno di *S.cerevisiae*. I ceppi batterici sono elencati in ordine di produzione di biofilm dal peggiore al migliore in senso verticale e per ciascuno è indicato anche il valore di OD t24/t0 ottenuto in monocultura (prima colonna). I ceppi di lievito sono elencati in ordine crescente di produzione di biofilm da sinistra a destra e per ciascuno è anche indicato il valore di OD t24/t0 ottenuto in monocultura, nella prima riga della tabella 3.6 .

Inoltre nella tabella sono evidenziate in colore chiaro le combinazioni che hanno prodotto un aumento nella produzione di biofilm della coppia, in colore più scuro le combinazioni in cui l'aumento è stato notevole (valore di OD t24/t0 superiore a 3), valutato in relazione alle rispettive produzioni in monocultura.

		AR1	AR3	NR14	NR8
	monocoltura	1,52	1,93	4,14	5,06
T30PCM07	0,72	4,67	3,44	2,93	3,29
T30PCM01	1,23	2,30	4,51	2,56	6,80
T0PCM14	1,33	2,33	4,48	1,33	2,47
T30PCM32	1,88	3,36	3,85	2,83	3,84
T0PCM49	2,21	2,98	6,04	2,52	7,72
T120PCM16	3,00	2,71	4,69	3,13	5,47
T30PCM38	3,47	3,28	1,70	3,07	3,96
T120PCM41	3,68	2,10	4,37	2,54	3,82
T0PCM17	4,19	2,56	4,45	5,00	5,54

		AR1	NR14	AR3	NR8
	monocoltura	1,71	2,75	3,93	4
T30PCM32	0,96	4,34	3,82	4,50	7,15
T0PCM49	1,14	1,11	1,65	1,00	6,18
T30PCM07	1,27	3,75	3,79	3,78	2,00
T0PCM14	1,65	2,69	2,12	1,61	3,76
T0PCM17	2,39	3,67	4,26	1,41	3,34
T30PCM01	3,80	1,49	2,33	3,78	4,66
T120PCM16	4,30	3,26	3,45	1,82	7,32
T30PCM38	4,40	3,58	2,82	3,37	4,54
T120PCM41	4,66	2,10	1,30	2,84	5,94

TAB 3.6 Valori di OD_{t24}/OD_{t0} ottenuti nelle combinazioni tra un ceppo di *L.plantarum* e uno di *S.cerevisiae*. In alto la situazione ottenuta in mosto, in basso la situazione in YPD.

Nella maggior parte dei casi la presenza di entrambi i ceppi ha prodotto un effetto positivo. Infatti il valore ottenuto nel mix è maggiore dei valori ottenuti per i singoli ceppi nel test in monocoltura. Ciò si verifica soprattutto in mosto dove più del 60% delle combinazioni sono positive contro il 50% in YPD. Dal 15% al 33% delle combinazioni sono invece risultate inibitorie rispettivamente in mosto e in YPD. Solo nel 15% dei casi il valore OD_{t24}/OD_{t0} del ceppo di *L.plantarum*

In figura 3.15 sono illustrati, in qualità di esempio, i risultati relativi a casi specifici di sinergismo ed inibizione.

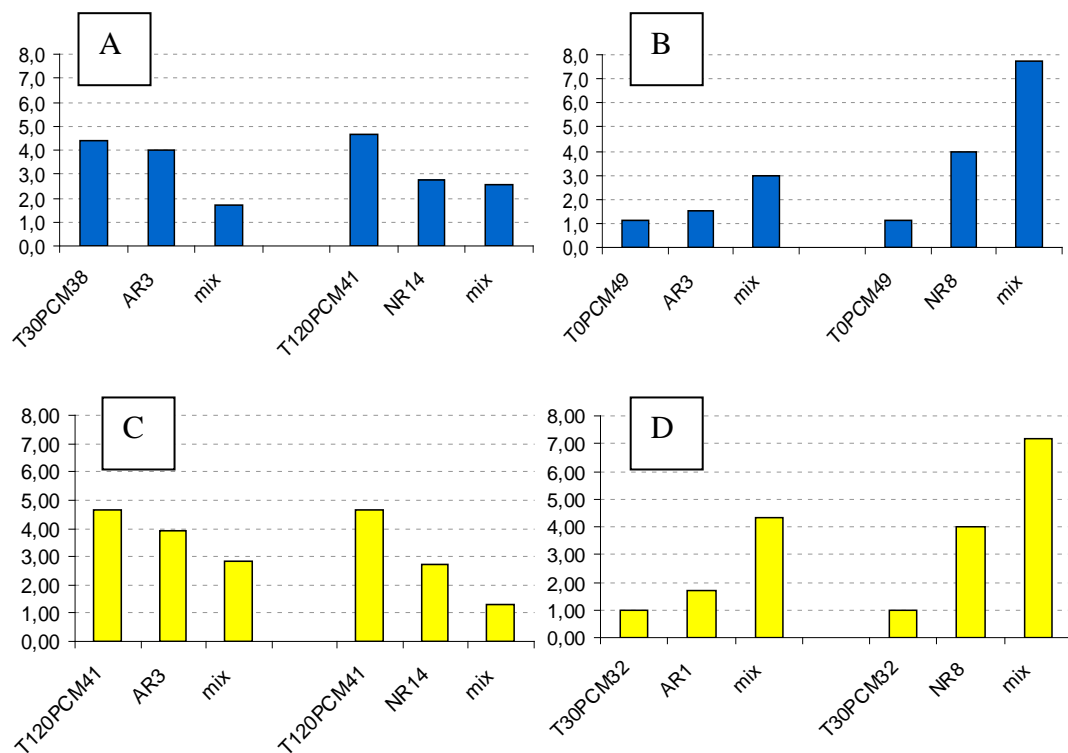


FIG 3.15 Confronto tra valori di OD_{t24}/OD_{t0} ottenuti per ceppi di *L.plantarum*, *S.cerevisiae* in monocultura e in coltura mista, per combinazioni sinergiche (B, D) e inibitorie(A,C). In alto in mosto e in basso in YPD

Inoltre, sia in mosto che in YPD solo una piccolissima percentuale di combinazioni non ha prodotto biofilm, mentre mediamente più dell'80% delle combinazioni sono risultate positive al test del cristallio. In particolare, le combinazioni che contengono ceppi di *L. plantarum* isolati a 30 giorni di stoccaggio hanno fatto registrare valori molto elevati, infatti il 75% di queste è risultata produrre un'ottima quantità di biofilm. Mentre tra le combinazioni che contengono ceppi di *L. plantarum* isolati all'inizio dello stoccaggio, solo il 40-50% hanno prodotto un'ottima quantità di biofilm. Quindi applicando questi risultati all'ambiente vinaccia, è possibile ipotizzare quanto segue. In questo matrice generalmente dall'interazione tra ceppi di *S. cerevisiae* e *L. plantarum* si ottiene una buona produzione di biofilm. Durante tempi lunghi di stoccaggio l'interazione risulta ancora più proficua rendendo ancor più evidente il sinergismo i due gruppi microbici.

I ceppi di *L.plantarum* che sono risultati i migliori in abbinamento al *S.cerevisiae* sono stati il T30PCM07 in mosto e il T30PCM32 in YPD che in ogni combinazione hanno sempre almeno raddoppiato il valore di OD t24/t0.

Il ceppo che ha prodotto sempre interazioni inibitorie con tutti i ceppi di *S.cerevisiae* è risultato il T30PCM38. E' interessante notare che questo ceppo è uno dei migliori produttori di biofilm in mono coltura con valori di OD t24/t0 vicini a 4 sia in mosto che in YPD. I ceppi T30PCM07 e T30PCM32 invece sono i ceppi che hanno fatto registrare valori più bassi in condizioni di monocultura.

Generalmente i ceppi di batteri testati riescono a interagire con il ceppo di lievito in modo tale da produrre una buona quantità di biofilm, anche se *S.cerevisiae* è presente in bassa concentrazione (10%) e soprattutto i ceppi che non dimostrano questa capacità in mono-coltura, sono quelli che interagiscono meglio con i lieviti. A fronte di una generale tendenza dei ceppi di *L.plantarum* ad essere buoni o discreti produttori di biofilm, in co-coltura si verificano delle interazioni ceppo specifiche che nella maggior parte dei casi si traducono in una stimolazione della formazione di biofilm.

Tale situazione trova delle analogie importanti con quanto osservato da Kawarai e colleghi (2007) nel sistema *L.casei subsp.rhamnosus* e *S.cerevisiae* nel riso destinato alla produzione del sake, dove mentre nessuno dei ceppi in monocultura era in grado di formare biofilm, alcune combinazioni in co-coltura risultavano buoni produttori. Interazioni positive sono state riscontrate anche in combinazioni a 4 specie di batteri isolati da un'alga marina (Burmolle *et al.*, 2006). In questo sistema, le specie che non erano in grado di produrre biofilm individualmente, hanno dato luogo a un enorme aumento della formazione di biofilm quando sono state combinate insieme. Gli autori hanno ipotizzato l'esistenza di un preciso ruolo di ciascuna delle specie batteriche, all'interno del biofilm multi specie: alla base della sinergia potrebbe esserci un sistema di composti secreti da alcune specie, incluse molecole segnale correlate al quorum sensing.

Poiché nelle nostre condizioni sperimentali utilizzate i lieviti sono presenti in piccola percentuale, dovrebbe essere il ceppo di *L.plantarum* a subire una stimolazione dei propri meccanismi biologici che portano all'attivazione del via del biofilm.

Si può ipotizzare che in presenza dei lieviti la formazione di biofilm da parte dei batteri possa essere stimolata ad esempio dal rilascio di molecole segnale da parte dei lieviti oppure per la formazione di uno strato basale di biomassa da parte dei

lieviti, fenomeno che potrebbe facilitare l'attacco dei batteri alla struttura con la creazione di un biofilm multi stratificato come osservato nel sistema *L.casei subsp.rhamnosus* e *S.cerevisiae* (Kawarai *et al.*, 2007).

4. CONCLUSIONI

Questo progetto di dottorato ha riguardato il monitoraggio delle dinamiche delle popolazioni di microrganismi, in particolare di batteri, che si sviluppano nel corso dello stoccaggio della vinaccia destinata alla produzione di grappa.

La vinaccia racchiude in sé tutto il potenziale per l'ottenimento di un distillato dalle caratteristiche tipiche del vitigno da cui proviene, e dalla sua lavorazione dipendono eventuali pregi e difetti della bevanda. Ciò è dovuto essenzialmente alla sua composizione, data da bucce, vinaccioli, una parte di mosto e in taluni casi anche raspi. Nelle bucce si concentrano infatti i composti glicosidati inodori, che costituiscono i precursori da cui, attraverso azioni enzimatiche da parte della pianta ma soprattutto dei microrganismi presenti sul grappolo, si liberano le molecole odorose volatili responsabili degli aromi varietali.

Al fine di preservare queste caratteristiche di partenza è opportuno porre particolare attenzione alle operazioni di conservazione e fermentazione della vinaccia vergine, dal momento della pressatura in cantina fino alla distillazione.

I microrganismi, ed i lieviti in particolare degradano gli zuccheri presenti trasformandoli in etanolo; accanto alla fermentazione alcolica però hanno luogo anche una serie di trasformazioni chimiche che portano alla produzione di composti indesiderati, che vengono poi concentrati nel processo di distillazione, i batteri con il loro metabolismo hanno un ruolo rilevante in questi processi. La conoscenza delle dinamiche riguardanti l'evoluzione della popolazione indigena che si sviluppa in questo contesto, rappresenta la chiave per attuare una serie di procedure appropriate per una corretta conservazione della vinaccia.

Le distillerie tecnologicamente più sviluppate mettono in atto una serie di tecniche per ottimizzare la conservazione della vinaccia, tecniche che sono normalmente impiegate nelle fermentazioni dei mosti. In particolare, oltre ai sistemi di stoccaggio che consentono di limitare l'aerazione della vinaccia, pressando la massa in modo da eliminare le sacche d'aria, si fa spesso ricorso all'acidificazione con SO₂, in modo da abbassare il pH, sfavorendo così la proliferazione dei batteri. Una pratica molto diffusa riguarda l'utilizzo di colture starter di lieviti selezionati. Ciò è dovuto al fatto che il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, protagonista della fermentazione alcolica, è presente sul grappolo in numero così limitato da essere sopraffatto da altre specie più numerose o da non essere in grado di avviare fermentazioni rapide.

Questo lavoro rappresenta il primo studio della vinaccia italiana destinata alla produzione di grappa che combina a un approccio microbiologico classico, uno

molecolare. Vista la scarsa presenza di dati sulla componente microbiologica in vinaccia, l'entità e la composizione di questa popolazione sono poco conosciute quindi il primo importante obiettivo è stato quello di comprendere la entità della microflora in vinaccia, e testare l'effetto sulla componente batterica di alcune tecniche innovative per la conservazione della vinaccia.

Nella prima parte del lavoro è stata monitorata per un periodo di 6 mesi una vinaccia di Prosecco, un vitigno tipico della Regione Veneto, mediante l'allestimento di una sperimentazione su scala pilota.

La prova sperimentale ha previsto la suddivisione della massa vegetale in due porzioni, una delle quali è stata sottoposta a un'iniziale refrigerazione per 8 ore, tramite aggiunta di pellet di CO₂. Successivamente il materiale vegetale non refrigerato è stato suddiviso in aliquote che sono state così trattate: una sottoposta all'acidificazione con aggiunta di H₂SO₄ e l'altra inocolata con un ceppo di lievito commerciale. La massa vegetale refrigerata invece è stata suddivisa in due parti di cui una inocolata con un lievito commerciale. Le aliquote di vinaccia sono state conservate in sacchi di plastica compressi e sigillati per tutta la durata della sperimentazione: questo si è rivelato efficace ai fini di creare un ambiente il più possibile privo di ossigeno e ha permesso di effettuare le procedure di prelievo evitando ogni forma di contaminazione.

Mediante metodi classici di analisi microbiologica è stato possibile determinare il numero di batteri presenti nella vinaccia durante l'insilamento. I batteri sono stati isolati dai campioni di vinaccia, mediante incubazione in condizioni di aerobiosi e di microaerofilia in modo da poter rilevare sia le specie aerobie come i batteri acetici che quelle microaerofile come i batteri lattici.

L'approccio quantitativo ha permesso di evidenziare la rilevante presenza dei batteri fin dall'inizio dello stoccaggio della vinaccia, in particolare all'inizio della sperimentazione la popolazione batterica aerobia è di $2,5 \times 10^6$ CFU/g ed è decisamente più numerosa rispetto a quella ottenuta incubando le piastre in condizioni microaerofile ($4,6 \times 10^5$ CFU/g).

Dopo 30 giorni di insilamento la popolazione batterica sia aerobica che anaerobica è aumentata di circa 100 volte in tutte le tesi analizzate tranne in quella acidificata, dove nonostante il pH sia stato abbassato solo di 0,3 unità, si è riscontrato un aumento della carica batterica di 10 volte rispetto al tempo T0.

La componente batterica aumenta ancora a 120 giorni per poi restare ad alte concentrazioni fino alla fine dell'insilamento quando si attesta su circa 10^7 CFU/g.

Dal confronto con l'andamento quantitativo dei lieviti in vinaccia, è stato possibile dimostrare che in vinaccia si assiste a una successione di microrganismi: i lieviti dominano la microflora all'inizio dell'insilamento della vinaccia per poi diminuire in quantità nelle fasi successive, quando la componente batterica prevale con una popolazione superiore di 100 volte rispetto ai lieviti, mentre alla fine dell'insilamento si ha un riequilibrio della situazione con lieviti e batteri presenti in quantità simili.

Le dinamiche di tipo microbiologico che caratterizzano la vinaccia quindi non sono perfettamente sovrapponibili a quelle del mosto: in entrambi i sistemi si assiste a una successione dei microrganismi con i lieviti che dominano la microflora all'inizio e dopo la fermentazione alcolica lasciano il passo ai batteri. Ma mentre nel mosto si ha una progressiva diminuzione della quantità dei lieviti a causa dei fenomeni di lisi cellulare e inibizione da parte dei batteri, in vinaccia le due componenti sono più equilibrate e infatti a tempi lunghi di insilamento lieviti e batteri sono presenti in quantità confrontabili.

Dopo lo studio dell'andamento quantitativo della componente batterica, è stata approfondita la conoscenza della microflora mediante un approccio molecolare che ha permesso di identificare le specie presenti in vinaccia e di capire come la popolazione evolve durante l'insilamento. Visti i risultati in termini quantitativi dell'acidificazione, è stata analizzata più approfonditamente la popolazione batterica isolata da vinaccia acidificata e da vinaccia non trattata per capire se il trattamento abbia avuto un effetto anche a livello qualitativo. Mediante l'analisi di più di 330 isolati batterici provenienti dalle vinacce acidificate e non trattate, sono state identificate le specie presenti ai diversi tempi di campionamento. La tecnica ARDRA basata sul 16S rDNA, abbinata al sequenziamento è risultata uno strumento efficace e veloce per individuare le specie batteriche presenti in vinaccia.

All'inizio la microflora è molto varia e rispecchia quella presente nella buccia, tra le specie identificate all'inizio dello stoccaggio ci sono batteri contaminanti come le *Enterobacteriaceae* e batteri acetici, il principale batterio lattico è *L.plantarum*. Durante il corso dell'insilamento della vinaccia si selezionano i soli

batteri lattici e in particolare *L.plantarum* che diventa la specie dominante nella vinaccia non trattata. Il corretto stoccaggio della vinaccia e in particolare la pressatura per ridurre l'aria hanno portato all'eliminazione delle specie contaminanti, tanto che a 30 giorni di stoccaggio, periodo in cui abitualmente avviene la distillazione, è presente solo *L.plantarum* nella vinaccia naturale non trattata.

Tra le tecniche sperimentate per controllare lo sviluppo microbico, la acidificazione della vinaccia ha dato ottimi risultati non solo in termini di inibizione della crescita dei batteri, ma anche a livello qualitativo, in quanto ha portato alla selezione della popolazione a favore della specie *O.oeni* che è più adattata ad ambienti acidi, eliminando altre specie di batteri lattici che non sono in grado di svilupparsi altrettanto bene a pH basso. Ulteriori studi sarebbero necessari per comprendere l'effetto di questo trattamento di acidificazione sulla qualità del distillato: sarebbe interessante capire se sono stati influenzati gli aromi tipici della grappa e se il cambiamento della specie presenti influenza la componente volatile estratta.

Una volta individuato nella specie *L.plantarum* il batterio prevalente e tipico della vinaccia di Prosecco, la seconda parte del lavoro ha previsto uno *screening* genetico a livello di ceppo di una settantina di isolati appartenenti al gruppo *L.plantarum* scelti tra quelli provenienti dalla vinaccia non trattata.

La messa a punto della metodica di tipizzazione rep-PCR basata sull'amplificazione di elementi ripetuti dispersi nel genoma batterico, ha permesso di studiare la struttura della popolazione riuscendo a individuare 41 diversi profili. La tecnica si è rivelata un potente strumento per studiare la struttura della popolazione di *L.plantarum*.

Inaspettatamente si è rivelata una elevata biodiversità genetica con molti profili unici e una popolazione sottoposta a una successione temporale che si spiega con la nota flessibilità di adattamento della specie *L.plantarum* a varie nicchie ecologiche, grazie alla complessità del suo genoma.

Inoltre il confronto genetico effettuato mediante analisi dei profili rep di ceppi di *L.plantarum* isolati da diverse matrici di origine animale e vegetale, ha permesso di confermare la specificità della popolazione proveniente da vinaccia.

Un risultato interessante di questa tipizzazione è stato il riconoscimento di alcuni isolati che appartengono alla specie *L.fabifermentum* prima non distinti da

L.plantarum sulla base della ARDRA. Si tratta di una specie descritta molto recentemente e che risulta molto vicina al gruppo *L.plantarum*. E' la prima volta che questa specie viene individuata in ambito enologico, ma è comunque una specie tipica del materiale vegetale fermentato e infatti è stata isolata originariamente dai semi fermentati del cacao.

L'analisi rep è stata poi applicata anche per la tipizzazione di 56 isolati della specie *O.oeni* provenienti da vinaccia acidificata. Questa analisi ha rivelato una notevole biodiversità anche nella popolazione *O.oeni*, indice della flessibilità genetica di questa specie dimostrata in molti lavori e supportata dalla flessibilità del suo genoma.

L'ultima parte del lavoro ha riguardato la caratterizzazione fisiologica degli isolati del gruppo *L.plantarum* precedentemente caratterizzati geneticamente con la tecnica rep-PCR.

La specie *L.plantarum* è il batterio prevalente e tipico della vinaccia di Prosecco e quindi risulta interessante approfondire la caratterizzazione di questa popolazione allo scopo di individuare eventuali proprietà fisiologiche che possono considerarsi tipiche della microflora in vinaccia o che possono essere applicate a livello tecnologico.

Come noto questa specie è produttrice di batteriocine dette plantaricine specialmente attive contro altri batteri lattici, meccanismo con cui essa colonizza nuove nicchie ecologiche eliminando la competizione di altri batteri con simili esigenze nutrizionali.

Per l'analisi della attività antimicrobica è stato usato un saggio di inibizione contro dei microrganismi indicatori, condotto sia in liquido in piastre multi pozzetto, sia su agar. Nessuno dei ceppi di *L.plantarum* testati ha evidenziato una attività antimicrobica contro gli indicatori testati, tranne quando il supernatante veniva concentrato. Questa condizione forzata non risulta però una condizione realmente verificabile, considerando le concentrazioni cellulari dei batteri in vinaccia. Nella vinaccia quindi non risulta evidente la produzione di batteriocine da parte degli isolati da noi testati e contro i microrganismi utilizzati da noi come indicatori. Ulteriori esperimenti sarebbero necessari per testare l'effetto della concentrazione cellulare del produttore sulla sua capacità di produrre batteriocine. Alcuni studi hanno evidenziato la necessità di una induzione della produzione di batteriocine, mediante il contatto tra il produttore e l'induttore: sarebbe

interessante testare l'effetto di una co-coltura di *L.plantarum* in presenza di un'altra specie batterica, studiando in modo più approfondito l'interazione tra microrganismo induttore e produttore.

Uno screening genetico per il pool di geni per le plantaricine permetterebbe di capire se gli isolati da vinaccia hanno effettivamente la potenzialità di produrre batteriocine.

Sarebbe anche interessante approfondire l'effetto di lisi che sembra avere *L.plantarum* contro un ceppo di batteri acetici, effetto non riconducibile all'azione delle batteriocine che infatti non sono attive generalmente contro i batteri Gram negativi. Ulteriori studi sarebbero necessari per comprendere la natura di questo processo, indagando le interazioni tra i due microrganismi.

Un'altra proprietà fisiologica scelta per la caratterizzazione della specie *L.plantarum* è la capacità di formare biofilm. Poiché la vinaccia è una matrice solida, questa capacità potrebbe essere un vantaggio notevole per i microrganismi che si trovano in vinaccia, in quanto permetterebbe loro di crescere alla superficie della massa vegetale.

E' stato ipotizzato che lieviti e batteri presenti sulla buccia dell'uva in vigneto, formino un biofilm alla superficie della bacca e tale struttura avrebbe il vantaggio di proteggere i microrganismi dagli stress ambientali e dall'aggressione di agenti chimici e fisici come i trattamenti antiparassitari, inoltre potrebbe rappresentare un meccanismo per catturare i nutrienti.

La formazione di biofilm è risultata essere una proprietà largamente diffusa tra la popolazione di *L.plantarum* isolata dalla vinaccia. In particolare la percentuale di buoni produttori aumenta all'aumentare del tempo di stoccaggio e sembra essere una capacità non intrinseca del ceppo e costitutivamente espressa, ma una capacità che si esprime maggiormente a tempi lunghi di stoccaggio. Questo indica che le condizioni di stoccaggio e l'ambiente vinaccia selezionano i ceppi che sono in grado di formare biofilm poiché solo questi sono in grado di sopravvivere nelle condizioni estreme dovute all'alta concentrazione di etanolo e di zuccheri, al pH e soprattutto alla presenza di una matrice solida di crescita.

Anche le interazioni tra *L.plantarum* e *S.cerevisiae* le due specie maggiormente presenti in vinaccia, indicano una cooperazione sinergica per la formazione di un biofilm multi specie che come dimostrato in altri ambienti, permette la

sopravvivenza in condizioni critiche grazie alla protezione fisica e alla cooperazione metabolica tra i microrganismi.

Ulteriori studi sarebbero necessari innanzitutto per confermare la presenza della struttura biofilm sulla superficie della bacca, ipotizzata da alcuni ma mai dimostrata. Inoltre studi ultrastrutturali del biofilm multi specie potrebbero permettere di comprendere il meccanismo di interazione tra *L.plantarum* e *S.cerevisiae*, soprattutto se condotti in un sistema più simile alle condizioni naturali, quindi per esempio sulla buccia dell'uva. In un sistema di questo tipo sarebbe anche possibile studiare l'effetto di una serie di parametri fisico chimici sulla formazione del biofilm multi specie e sulla sua struttura.

In conclusione con questo lavoro è stato possibile aumentare le conoscenze relative alla biodiversità e alle dinamiche di popolazioni di batteri presenti nell'ambiente vinaccia. Lo studio di questa matrice vegetale ha portato alla scoperta di un ambiente con caratteristiche decisamente peculiari in quanto costituito principalmente da una componente solida che può fungere anche da supporto per la crescita microbica ed essendo costituita da una massa di tanti compartimenti, può risultare una matrice ricca di interessanti nicchie ecologiche atte a favorire l'incremento della biodiversità.

Il lavoro svolto ha anche un'applicazione pratica in quanto ha contribuito a chiarire, dal punto di vista microbiologico, le problematiche connesse alla conservazione della vinaccia. In particolare è stata dimostrata l'efficacia del trattamento di acidificazione della vinaccia nel contenimento dello sviluppo microbico e quindi tale pratica può essere proposta ai produttori, per migliorare le fasi di lavorazione della materia prima.

Un aspetto interessante riguarda la dinamica delle popolazioni batteriche a tempi lunghi di stoccaggio, quando inaspettatamente la componente microbica si è dimostrata ancora quantitativamente rilevante.

Questo aspetto risulta interessante e da approfondire per capire quale può essere il contributo e il ruolo dei batteri lattici presenti a tempi lunghi di stoccaggio, infatti le distillerie, spesso per motivi di gestione logistica, arrivano a distillare la materia prima dopo 3 o addirittura 6 mesi di insilamento.

5. BIBLIOGRAFIA

Alegria G., Lopez I., Ruiz I., 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 microbiology letters* 230:53-61

Arena M.E. e Manca de Nadra M.C. (2001) Biogenic amine production by *Lactobacillus* . *Journal of applied microbiology* 90:158-162

Arena M.E., Fiocco D., Manca de Nadra M.C., Pardo I., Spano G. (2007) Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current microbiology* 55:205-210

Bae S., Fleet G.H., Heard G.M. (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100: 712-727.

Bae S., Fleet G.H., Heard G.M. (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100: 712-727.

Bartowsky E. (2009) Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in applied microbiology* 48:149-156

Bartowsky E., Henschke P., (2008) Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine- a review. *International journal of food microbiology* 125:60-70

Bayly J.C., Douglas L.M., Pretorius I.S. , Bauer F., Dranginis A. (2005) Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 5:1151–1156

Ben Amor K., Vaughan E. E., de Vos W. M.(2007) Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Nutrition* 137:741-747.

Bon E., Delacherche A., Bilhere E., De Daruvar A., Lonvaud-Funel A., Le Marrec (2009) *Oenococcus oeni* genome plasticity is associated with fitness. *Applied and environmental microbiology* 75(7):2079-2090

Burmølle M., Webb J., Rao D., Hansen L.H., Sørensen S. and Kjelleberg S. (2006) Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and environmental microbiology* 72 (6) : 3916–3923.

Camu N., De Winter T., Verbrugge K., Cleenwerck I., Vandamme P., Takrama J. S., Vancanneyt M., De Vuyst L.(2007) Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana. *Applied and environmental microbiology* 73(6): 1809–1824

Carr, J. G. e Davies, P. A. (1972) The ecology and classification of strains of *Lactobacillus collinoides* nov. spec.: a bacterium commonly found in fermenting apple juice. *J Appl Bacteriol* 35:463–471.

Chevallier B., Hubert J. C., Kammerer B. (1994) Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 120:51-56.

Cleenwerck I., Camu N., Engelbeen K., De Winter T., Vandemeulebroecke K., De Vos P., De Vuyst L.(2007) *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1647–1652

Cleenwerck I., Vandemeulebroecke K., Janssens D., Swings J. (2002) Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1551–1558

Cotter P.D., Hill C., Ross P.R. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews* 3:777-788.

Da Porto C. (2002), Volatile composition of “grappa low wines” using different methods and conditions of storage on an industrial scale. *International Journal of Food Science and Technology*. 37:395-402.

Davey M. and O’Toole G. (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* 64(4):847–867

De Bruyne K., Camu N., De Vuyst L., Vandamme P. (2009) *Lactobacillus fabifermentans* sp. nov. And *Lactobacillus cacaonum* sp. nov., isolated from Ghanaian cocoa fermentations . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59:7–12

De Pina C. G. e Hogg T. A. (1999) Microbiological and chemical changes during the spontaneous ensilage of grape pomace. *Journal of applied microbiology* 86:777-784.

De Rosa T. e Castagner R. (1994) Tecnologia delle grappe e dei distillati d’uva. *Ed agricole*

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. *International Journal of Food Microbiology* 125:79–90

Diep D.B., Straume D., Kjos M., Torres C., Nes I. (2009) An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* 30(8): 1562-1574

- Endo A. e Okadal S. (2008) Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposal of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58(9):2195-2205
- Fleet G.H. (1993) The microorganisms of winemaking-isolation, enumeration and identification. In *Wine Microbiology and Biotechnology* ed. Fleet, G.H. pp1-25. Switzerland: Harwood Academic Publisher
- Fleet G.H. (2003) Yeast interaction and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 11-22.
- Fujii T., Ingham C., Nakayama J., Beerthuyzen M., Kunuki R., Molenaar D., Sturme M., Vaughan E., Kleerebezem M., de Vos W. (2008) Two homologous Agr-like quorum sensing systems cooperatively control adherence, cell morphology and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J. of Bacteriol.* 190(23): 7655-7665.
- 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. *Applied and environmental microbiology* 69(2):1270-1275
- Gevers D., Huys G., Swings J. (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* 205: 31-36
- Groisillier A. e Lonvaud-Funel A. (1999) Comparison of partial malolactic enzyme gene sequences for phylogenetic analysis of some lactic acid bacteria specie and relationships with the malic enzyme. *International journal of systematic bacteriology* 49:1417-1428
- Hayashi N.R., Ishida T., Yokota A., Kodama T. e Igarashi Y. (1999) *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemo lithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:783-786

Hollis D. G., Hickman F. W., Fanning G. R., Farmer J. J. , Weaver R. E., Brenner J. (1981) *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 14(1):79-88

Izard, D., Gavini, F. & Leclerc, H. (1980). Polynucleotide sequence relatedness and genome size among *Enterobacter intermedium* sp. nov. and the species *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig Reihe C* 1:51–60.

Jefferson K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236:163-173.

Kawarai T., Furukawa S., Ogihara H., Yamasaki M. (2007) Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (14): 4673-467

Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O. P., Leer R., Turchini R., Peters S. A., Sandbrink H. M., Fiers M. W. E. J., Stiekema W., Lankhorst R. M. K., Bron P. A., Hoffer S. M., Nierop Groot M. N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W. M. e Siezen R. J., (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1990-1995.

Knoll C., Divol B., du Toit M.(2008) Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiology* 25:983–991

Kostinek M., Ban-Koffi L., Ottah-Atikpo M., Teniola D., Schillinger U., Holzappel W., Franz C. (2008) Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Current microbiology* 56:306-314

Kostinek M., Specht I., Edward A., Schillinger U., Hertel C., Holzapfel W., Franza C. (2005) Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and applied microbiology* 28:527-540

Kubota H., Senda S., Nomura N., Tokuda H., Uchiyama H. (2008) Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 106(4): 381-386.

Kubota H., Senda S., Tokuda H., Uchiyama H., Nomura N. K. (2009) Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology* 26 : 592–597

Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J Gen Appl Microbiol* 47:119–131.

Lonvaud-Funel A. e De Saad S. (1982) Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. *Applied and environmental microbiology* 43:357-361

Lupski J. e Weinstock G.M. (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology* 174(14): 4525-4529.

Makarova K. e Koonin E. (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology* 189(4):1199-1208

Makarova K., Slesarevb A., Wolfa Y., Sorokina A., Mirkinc B., Koonina E., Pavlovb A., Pavlovab N., Karamychevb V., Polouchineb N., Shakhovab V., Grigoriev I., Loue Y., Rohksare D., Lucase S., Huange K., Goodsteine D. M., Hawkinse T., Plengvidhyaf V., Welkeri D., Hughesi J., Gohj Y., Bensonj A., Baldwink K., Leek J.-H., I. Di'az-Mun~ izf,l, Dostil B., Smeianovl V., Wechterf W., Barabotem R., Lorcaf G., Altermannf E., Barrangouf R., Ganesann B., Xief Y., Rawsthornef H., Tamirf D., Parkerf C., Breidtfg F., Broadbentof J., Hutkinsj R.,

O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Marcobal A.M., Sela D.A., Wolf Y.I., Makarova K., Mills D. (2008) Role of the hypermutability in the evolution of the genus *Oenococcus*. *Journal of bacteriology* 190:564-570

Mills D., Rawsthorne H., Parker C., Tamir D., Makarova K. (2005) Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS microbiology reviews* 29:465-475

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. *Journal of Digestive Diseases* 9:190–198

Mohapatra R., Broersma K., Mohapatra A.M. (2007) Comparison of rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters* 277 : 98–106

Monds R. eO'Toole G. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology* 17 (2): 73-87.

Moreno-Arribas M.V., Polo M.C., Jorganes F., Munoz R. (2003) Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84:117-123

Muresu R., Sulas L., Polone E., Squartini A., 2005. PCR primers based on different portions of insertion elements can assist genetic relatedness studies, strain fingerprinting and species identification in rhizobia. *FEMS Microbiology ecology* 54:445-453.

Navarro L., Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Díez L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2008) Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin producing *L. plantarum* J51 strain. *International Journal of Food Microbiology* 128: 390–394

Navarro L., Zarazaga M., Saenz J., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2000) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology* 88: 44-51.

O'Toole G. and Kolter R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas* WCS365 proceeds via multiple, converging signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* 28(3):449-461.

Odello L., Giomo A., Versini G., Zironi R. (1997) Grappa analisi sensoriale & Tecnologie, Ed. Centro studi e formazione assaggiatori, Brescia.

O'Toole G., Pratt L., Watnick P., Newman D., Weaver V., Kolter R. (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology* 310: 91-109

Palkova Z. and Vachova L. (2005) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology review* 30: 806–824

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

Pavan M., Franco R., Rodriguez J.M. , Gadaleta P., Abbott S., Janda J.M., Zorzopulos J. (2005) Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia* . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:437–442

Prieto C., Jara C., Mas A., Romero J. (2007) Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International journal of food microbiology* 115:348-355

Rasschaert G., Houf K., Imberechts H., Grijspeerdt K., De Zutter L., Heyndrickx M. (2005) Comparison of Five Repetitive-Sequence-Based PCR

Typing Methods for Molecular Discrimination of *Salmonella enterica* Isolates. *Journal of clinical microbiology* 43(8): 3615–3623

Reguant C. e Bordons A. (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 95:344–353

Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A. (2005) Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 316–327

Renouf V., Delaherche A., Claisse O., Lonvaud-Funel A.(2008) Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 35:27–33

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2003) Trattato di enologia Volume 1 Maturazione dell'uva, fermentazione alcolica, vinificazione, Ed agricole.

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.

Rodas A. M., Ferrer S. , Pardo I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 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. *Systematic and Applied Microbiology* 26: 412-422

Rojo-Bezares B., Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2007) Coculture-inducibile bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food microbiology* 24: 482-491.

- Ruberto G., Renda A., Amico V., Ttringali C. (2008) Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L., *Bioresource Technology*, 99:260-268.
- Saenz Y., Rojo-Bezares B., Navarro L., Díez L., Somalo S., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2009) Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Food Microbiology* 134(3):176-183
- Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *PNAS* 103(42): 15611–15616
- Sauvageot N., Gouffi K., Laplace J., Auffray Y. (2000) Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology* 55(1-3) : 167-170
- Schleifer K. (2009) Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*. 32:533-542.
- Sico M., Bonomo M., D'Adamo A., Bochicchio S., Salzano G. (2009) Fingerprinting analysis of *Oenococcus oeni* strains under stress conditions. *FEMS Microbiology Letters* 296 : 11–17
- Simova E.D., Beshkova D.B., Dimitrov Zh.P. (2009) Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology* (2009) 106:692–701
- 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 Journal of Microbiology & Biotechnology* 22:769-773.

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. *Journal of applied microbiology* 96:185-193

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. *Current microbiology* 54 : 9–13

Sturme M., Francke C., Siezen R., de Vos W., Kleerebezem M. (2007) Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology* 153:3939-3947.

Suzuki K., Funahashi W., Koyanagi M., Yamashita H. (2004) *Lactobacillus paracollinoides* sp. nov., isolated from brewery environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:115–117

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. *Applied and environmental microbiology* 67(8):3450-3454.

Versalovic J., Koeuth T., Lupski (1991) Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. *Nucleic acid research* 19(24):6823-6831.

Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.

Verstrepen K.J. and Klis F.M. (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*. 60: (1), 5–15

Vescovo M., Torriani S., Dellaglio F., Bottazzi V. (1993). Basic characteristics, ecology and application of *Lactobacillus plantarum*: a review. *Annual Microbiology Enzimology* 43:261-284.

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

Zambonelli C. (2003) *Microbiologia e Biotecnologia dei Vini*, Edagricole.

Zhang Z.Y., Liu C., Zhu Y.Z., Zhu Y.Q., Zheng H.J., Zhao G.P., Wang S.Y., Guo X.K. (2009) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. *Journal of bacteriology* 191(15):5020-5021.

Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F. (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in applied microbiology* 27:243-246.