

Applicazioni della Biologia Molecolare all'Enologia

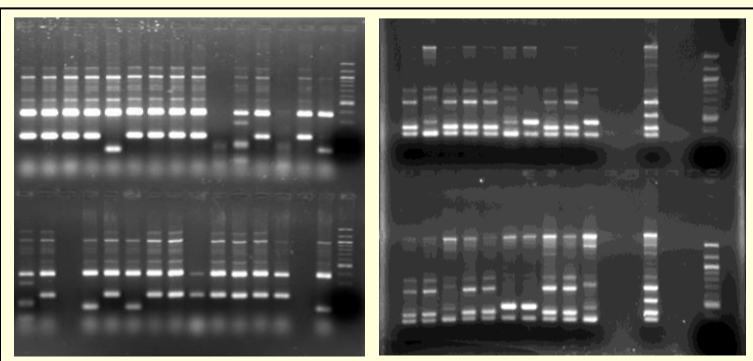
In passato, la scarsa diffusione delle conoscenze prima e l'elevatissimo costo di accesso poi ha confinato l'utilizzo delle tecniche biomolecolari a sporadici e circoscritti controlli (come la verifica di dominanza del ceppo di lieviti o di batteri in fermentazione), il cui esito era peraltro molto differito nel tempo.

Oggi la disponibilità di nuove e più raffinate tecnologie, le maggiori conoscenze e disponibilità dei materiali di riferimento, rende questa tecnologia competitiva rispetto alle tecniche manuali, e soprattutto consente di ottenere informazioni estremamente circostanziate ed in tempi rapidi.

Le nuove frontiere: la PCR

La PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) permette di moltiplicare a ritmo esponenziale brevi sequenze note di acidi nucleici. In Enologia questa tecnica può essere impiegata per il monitoraggio e l'identificazione dei microrganismi durante la fermentazioni alcolica e malolattica.

L'identificazione si effettua per confronto tra gli organismi rinvenuti e dei controlli positivi mediante l'analisi dei profili elettroforetici derivanti dall'amplificazione di alcuni tratti del DNA.



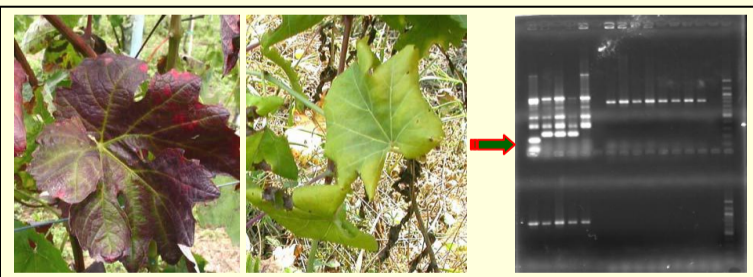
Dominanza del ceppo:

1) Lievito *Saccharomyces Cerevisiae*; 2) Batteri lattici.

La PCR è uno strumento di screening affidabile e sensibile anche per l'identificazione di patologie fitosanitarie, sebbene sia al vaglio l'adozione di metodiche legate alla tecnologia *Real Time*.

La flavescenza dorata (FD) è una fitoplasma appartenente al gruppo dei giallumi, generalmente accompagnata dalla colorazione giallodorata delle foglie, dei tralci e dei grappoli di vitigni a bacca bianca. L'agente è un fitoplasma che si insedia nel floema dell'ospite e ne provoca il blocco della linfa elaborata, inducendovi uno squilibrio fisiologico.

Il Legno nero (LN), a sua volta indotto da un fitoplasma, determina l'accartocciamento della fo-



Flavescenza dorata e Legno Nero.

glia e la lignificazione di alcune parti del tralcio.

Real-Time PCR

La Real Time è un'evoluzione della PCR che permette di **quantificare** il frammento amplificato mediante l'utilizzo di marcatori fluorescenti. È una tecnologia largamente utilizzata, particolarmente sensibile e fornisce risultati altamente riproducibili ed affidabili in tempi brevissimi. Tra i microrganismi vengono rilevati anche quelli "non coltivabili" (non rilevabili mediante tecniche di coltivazione su piastra); questi individui quiescenti, di dimensioni molto ridotte, sembra non siano separabili per filtrazione sterile.

Applicazioni attuali:

Brettanomyces

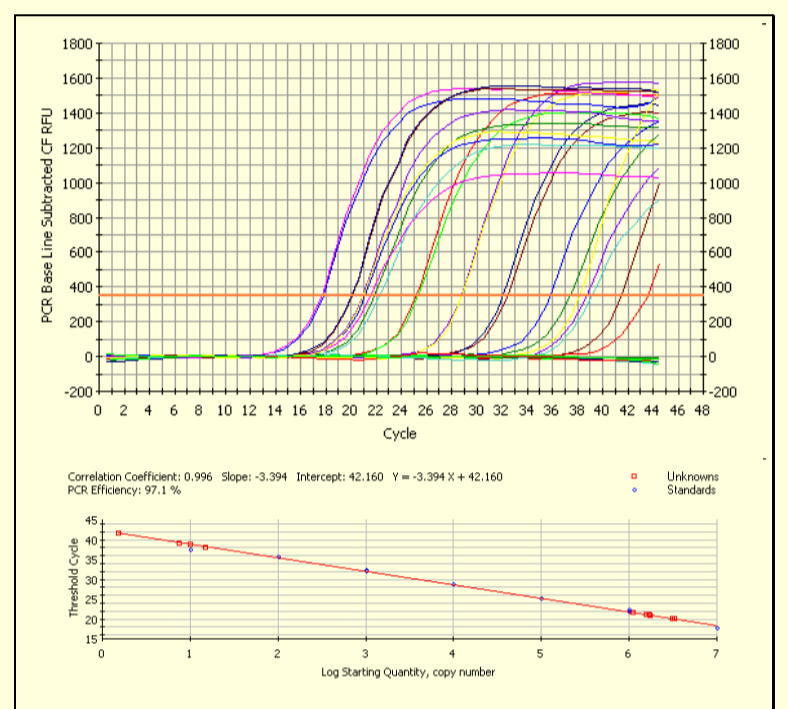
Isvea impiega questa tecnica per ricercare e quantificare microrganismi agenti di gravi difetti sensoriali nel vino, primo fra tutti *Brettanomyces*, responsabile della comparsa di odori di natura fenolica, plastica, di panno umido, di urina di topo, di sudore di cavallo, di vernice ecc., ascrivibili alla sua capacità di produrre una serie di composti indesiderati (tra i quali i più temibili sono il **4-etilfenolo** ed il **4-etilguaiacolo**) generalmente in una fase successiva a quella di moltiplicazione cellulare: ciò rende opportuno tenere sotto controllo sia l'entità della contaminazione che il tenore in fenoli volatili. L'utilizzo della RT-PCR risulta particolarmente indicato per la sua proprietà di quantificare anche le cellule altrimenti non coltivabili.

Pediococchi

Anche la crescita di *Pediococchi* nel vino è associata alla formazione di molecole in possesso di odori sgradevoli (ex. **diacetile**).

L'identificazione molecolare di *Brettanomyces* e di *Pediococchi* si realizza per confronto tra il campione in analisi ed un controllo positivo. La

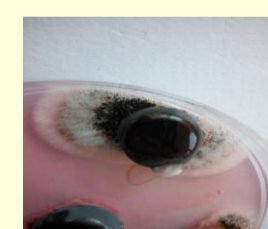
retta di calibrazione si costruisce con l'uso di una coltura pura, del lievito o della cellula batterica, a diversi livelli di diluizione.



Sviluppi futuri

Il danneggiamento degli acini di uva, con la conseguente fuoriuscita di succo, provoca lo sviluppo di popolazioni microbiche con valori di 10^6 - 10^8 ufc/g caratterizzate dalla presenza di funghi filamentosi, come ad esempio *Botrytis cinerea*. Da ciò possono derivare tenori elevati di micotossine ed alterazioni compositive dannose per la qualità sensoriale del vino sia in termini diretti che per le potenziali interferenze con la fermentazione alcolica e malolattica.

Il sopra citato microrganismo, insieme al *Penicillium expansum* è responsabile della produzione di **geosmina** e di **cloroanisoli**, responsabili di anomalie sensoriali in alcuni vini.



L'*Aspergillus carbonarius*, infine, è ritenuto il principale responsabile della produzione dell'**Ocratossina A** (OTA), micotossina nefrotossica e cancerogena. Sebbene i cereali ne rappresentino la fonte principale, il vino si trova in seconda posizione e la sua eventuale contaminazione è sottoposta a limite (Reg. CE 123/2005).

La ricerca di questi microrganismi sulle uve, possibilmente nelle fasi precoci di insediamento, può consentire di intervenire preventivamente alla contaminazione o ai suoi effetti sul vino nelle prime fasi dell'elaborazione. Sulle uve sarà presto possibile rilevare la contaminazione da *Botrytis cinerea* prima ancora di essere in grado di valutare l'attività della Laccasi sul mosto, disponendo così di preziose indicazioni preventive circa le operazioni da condurre già in fase prefermentativa. Infine, sono in fase avanzata di sviluppo metodi RT-PCR per la ricerca e la quantificazione di Batteri Acetici e Batteri Lattici (*Oenococcus oeni*) in vino.

Bibliografia essenziale:

- M.V. Selma et al. (2008): Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Int J Food Microbiol*, **122**, 126-134.
- M.B. Suarez et al. (2005): Development of Real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiol Biochem*, **43**, 890-899.
- T.G. Phister, D.A. Mills (2003): Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl Environ Microbiol*, Dec, 7430-7434.
- M. Martini et al. (2002): Genetic variability among flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Mol Cell Probes*, **00** 1-12.
- L. Granchi et al. (1999): Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J Appl Microbiol*, **87**, 949-956.