

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E VALUTAZIONE DELLA RESISTENZA
ALL'ANIDRIDE SOLFOROSA DI *Dekkera bruxellensis*

Nel settore enologico *Brettanomyces* è considerato responsabile di alterazioni olfattive che si manifestano nel corso dell'affinamento e della conservazione dei vini in legno. *Dekkera*, la forma asporigena di *Brettanomyces*, è in grado di degradare gli acidi idrossicinnamici, naturalmente presenti nell'uva e nel vino, formando composti di odore sgradevole definiti fenoli volatili, più specificatamente il 4-etil-fenolo e il 4-etil-guaiacolo (Chatonnet e Boidron, 1988; Etievant, 1981). Questi composti sono riconducibili ai descrittori di panno bagnato, stalla, medicinale, cuoio e vernice, che formano la così detta nota "Brett" (Fugelsang, 1997). Poiché *Brettanomyces*, sopravvive e si moltiplica in condizioni proibitive per altri microrganismi ed è molto difficile la sua eradicazione, è considerato una delle principali problematiche dell'enologia moderna

Attualmente l'unica strategia utile è di tipo preventivo, l'antimicrobico di efficacia comprovata nel vino è l'anidride solforosa. Una concentrazione di 40 mg/l di solforosa libera è sufficiente ad arrestare lo sviluppo di *B. bruxellensis* nel vino (Gerbaux et al., 2000).

Lo scopo della tesi è quello di effettuare una caratterizzazione fenotipica e genetica di ceppi appartenenti alla specie *Dekkera bruxellensis* con diverse tecniche molecolari e con particolare attenzione alla capacità di resistenza all'SO₂.

La collezione era costituita da 18 ceppi reperiti dalla collezione internazionale CBS, e da 34 ceppi isolati da mosti e vini provenienti da diverse cantine.

L'identificazione della specie è stata ottenuta mediante amplificazione delle regioni ITS (regioni spaziatrici dell'rDNA) e successiva digestione con un enzima di restrizione (Hin6I). Tali analisi hanno confermato che i ceppi presi in esame erano appartenenti alla specie *Dekkera bruxellensis* e, dall'analisi dei profili di restrizione enzimatica, è stata riscontrata una variabilità genetica tra i ceppi in collezione, sono stati infatti individuati 3 diversi profili. Per la tipizzazione a livello di ceppo è stata utilizzata l'analisi del DNA mitocondriale, affiancata all'amplificazione di regioni introniche caratteristiche individuate all'interno del genoma di *Dekkera*. L'analisi del DNA mitocondriale non è risultata sufficientemente discriminativa, ma combinata ad una seconda tecnica molecolare costituisce un nuovo e promettente strumento in quanto ha permesso di differenziare efficacemente i

ceppi.

Parallelamente sono state fatte delle prove fisiologiche atte a valutare la produzione di idrogeno solforato e la resistenza dei diversi ceppi all'aggiunta di anidride solforosa in un mosto sintetico.

La produzione di idrogeno solforato è stata valutata mediante coltivazione delle cellule su terreno Biggy, le cellule sono cresciute producendo una patina di diversa colorazione, indicando che i diversi ceppi producono quantitativi differenti di H₂S durante il loro sviluppo.

La resistenza all'SO₂ è stata valutata inoculando le cellule in un mosto sintetico al quale sono state aggiunte concentrazioni crescenti di metabisolfito di potassio 100 mg/l; 150 mg/l; 200 mg/l. Le concentrazioni di SO₂ non sono risultate sufficienti ad inibire completamente la crescita, i diversi ceppi si sono sviluppati però con tempistiche differenti, ad indicare che le cellule subiscono un'inibizione diversa a secondo del ceppo di appartenenza.

Un possibile sviluppo di questa ricerca è un'indagine, nel genoma di *Dekkera bruxellensis*, volta ad individuare geni implicati nel meccanismo genetico di resistenza all'anidride solforosa.