

RIASSUNTO

I lieviti appartenenti al genere *Dekkera/Brettanomyces* sono spesso coinvolti nella produzione di vino e birra, sia come ceppi positivamente legati alla preparazione delle bevande, sia come agenti deterioranti. I ceppi normalmente coinvolti in fenomeni alterativi durante la vinificazione appartengono alla specie *Brettanomyces bruxellensis*.

Esso è stato rilevato sia sui grappoli (Arojo et al., 1998; Pretorius, 2000) sia in cantina (Peynaud e Domercq, 1956). Questo determina un'elevata probabilità di inquinamento dei vini da parte di questo microrganismo nelle fasi di affinamento. I problemi causati da questo lievito sono di ordine sensoriale. Sono in grado di degradare gli acidi idrossicinnamici 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, urina di topo, stalla, medicinale, lana bagnata, cuoio, garofano e vernice, e formano la così detta nota "Brett" (Fugelsang, 1997). Lo sviluppo di questi composti è il risultato di una duplice attività enzimatica del microrganismo: una decarbossilazione, che porta alla produzione del 4-vinil-fenolo e del 4-vinil-guaiacolo operata da specifiche decarbossilasi (cinnamato decarbossilasi, CD). I vinili così prodotti vengono ulteriormente ridotti a formare il 4-etilfenolo e il 4-etilguaiacolo, rispettivamente, mediante l'azione di vinilriduttasi (VR).

Lo scopo della tesi è stato quello di valutare queste attività enzimatiche in due ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* (CBS 2499 e CBS 4481).

Per questo lavoro sono stati messi a punto due metodi analitici, uno legato all'analisi HPLC dei composti e uno legato al dosaggio enzimatico allo spettrofotometro. Il metodo HPLC permetteva di ottenere l'analisi delle singole triadi di composti (acido, vinile ed etile) coinvolti nell'attività degli enzimi; a questo scopo sono stati usati come eluenti H₂O + 0,1% TFA e acetonitrile con una colonna a fase inversa. Il protocollo per il dosaggio enzimatico prevedeva di allestire una cuvetta con l'estratto cellulare e il cofattore (NADH e NADPH) in modo da consumare tutte le reazioni presenti nell'estratto, una volta avvenute queste reazioni viene

aggiunto il substrato in modo da identificare l'attività enzimatica ricercata. Le letture sono state eseguite a 340nm con cuvette in quarzo.

L'attività nei confronti dei due acidi è stata valutata utilizzando cellule non proliferanti ed estratti enzimatici solubili ottenuti a partire dalle cellule intere.

Le prove sono state allestite con cellule raccolte dopo centrifugazione e lavaggio. Le cellule non proliferanti sono state sospese in tampone fosfato (pH 6,8 0,1M) con l'aggiunta degli acidi (0,5 g l⁻¹). Inoltre sono state svolte anche in presenza di cosubstrati (50 g l⁻¹) quali glucosio, etanolo, xilosio e glicerolo.

I risultati ottenuti dalle biotrasformazioni con cellule non proliferanti, sia sul ceppo CBS 2499 che sul ceppo CBS 4481, mostrano che, in presenza dei soli acidi, le cellule presentano un'ottima attività decarbossilasica ma non presentano attività riduttasica. Al contrario, nelle prove in cui venivano forniti i cosubstrati si osserva, in alcuni casi, un'attività della vinilriduttasi con conseguente comparsa dei due etili. Solo nelle prove con xilosio la formazione degli etili era nulla o molto limitata.

Sono state quindi condotte prove con estratti enzimatici solubili ottenuti da *pellet* sospesi in tampone fosfato contenuto di ditiotritolo (1mM) e cocktail di inibitori delle proteasi (1 µl ml⁻¹); gli estratti erano ottenuti dopo rottura meccanica con palline di vetro. Le biotrasformazioni erano condotte in presenza di NADH e NADPH.

Le biotrasformazioni sono state effettuate sia con la frazione liquida che col *pellet* residuo. Si è evidenziato che il ceppo CBS 2499 non presenta un'attività riduttasica significativa, mentre il ceppo CBS 4481 possedeva un'attività riduttasica sia nella frazione liquida che nel *pellet*.

L'attività delle VR nella frazione liquida è promossa in presenza di NADH; nelle prove con NADPH si nota un'attività riduttasica minore. Col *pellet* l'attività rilevata è molto bassa sia nelle prove con NADH che in quelle con NADPH.

Sulla base di questi risultati, il dosaggio enzimatico è stato svolto solo con il ceppo CBS 4481. I dati ottenuti confermano che nelle prove con la frazione liquida si verifica la presenza dell'attività riduttasica in presenza di NADH, mentre col NADPH l'attività è minima. L'attività riscontrata col *pellet* è molto ridotta.

I dati ottenuti indicano come la produzione degli etilfenoli avvenga in presenza di un cosubstrato, glucosio e etanolo, che permette la rigenerazione di cofattori ridotti che partecipano alle reazioni di riduzione

attuata dalle VR. Le biotrasformazioni effettuate con estratti enzimatici indicano che l'enzima è in grado di usare come cofattori sia NADH che NADPH, con una maggior preferenza verso l'uso del NADH.

In conclusione, in questo lavoro si sono valutati alcuni aspetti preliminari riguardante l'attività enzimatica coinvolta nelle reazioni di trasformazione di acidi cinnamici da parte dei due ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* in modo da poter iniziare un lavoro di caratterizzazione molecolare che possa portare all'individuazione degli enzimi e quindi dei geni codificanti.