

CARATTERIZZAZIONE DI VINILFENOL REDUTTASI DA *Brettanomyces bruxellensis*

Dekkera/Brettanomyces bruxellensis può essere responsabile di alterazioni del profilo sensoriale dei vini, deprezzandone l'aroma. Tra le molecole responsabili di tali alterazioni si segnalano il 4-vinilfenolo, i cui descrittori olfattivi sono farmaceutico, vernice, elastoplast; 4-vinilguaiacolo (garofano, speziato), 4-etilfenolo (cuoio, stalla, sudore di cavallo) e 4-etilguaiacolo (affumicato, speziato). La biosintesi di questi composti, definiti fenoli volatili, vede l'attività enzimatica sequenziale di due enzimi. Il primo è una cinnamato decarbossilasi (CD), in grado di trasformare gli acidi cinnamici liberi (non esterificati con l'acido tartarico) in vinilfenoli. La specificità di questo enzima è differente da quello di *Saccharomyces cerevisiae*, in quanto in quest'ultimo l'enzima non sarebbe inibito dalla presenza di composti fenolici. Gli idrossistireni così ottenuti possono essere ridotti ad etil-derivati da un secondo enzima, la vinilfenolo reduttasi (VR), assente in *Saccharomyces cerevisiae* ma presente solo nel genere *Brettanomyces*.

Quest'ultimo enzima costituisce l'oggetto di studio di questa tesi.

L'attività della VR è correlata alla presenza del cofattore nicotinammidico NADH, secondo quanto è stato dimostrato da precedenti attività di tesi condotti sia su cellule intere che su estratto cellulare.

Il ceppo studiato è *Dekkera bruxellensis* CBS 4481, in recenti studi considerato un potenziale forte produttore di fenoli volatili (Vigentini et al., 2008).

È stata valutata la capacità delle cellule intere di convertire i diversi substrati (acido ferulico o 4-vinilguaiacolo), allestendo biotrasformazioni con cellule provenienti da diverse condizioni di crescita in beuta (tempi di crescita e substrati di induzione diversi). La conversione del substrato è stata valutata mediante HPLC. Il tempo di crescita in beuta delle cellule di *Dekkera bruxellensis* CBS 4481 ha un ruolo rilevante nella capacità delle cellule intere di produrre fenoli volatili: la maggior conversione molare e velocità di produzione di fenoli volatili, partendo da acido ferulico, si verifica in seguito ad una crescita di 48 ore. Nelle biotrasformazioni allestite con 4-

vinilguaiacolo, invece, si ha la più elevata conversione molare in seguito ad una crescita di 24 ore.

La presenza, in fase di crescita, di diversi substrati d'induzione, come acido ferulico e 4-vinilguaiacolo, non influenza la capacità di produrre fenoli volatili: si tratta pertanto di geni costitutivamente espressi.

Sono stati sperimentati diversi metodi di rottura fisica delle cellule di *Dekkera bruxellensis* CBS 4481, al fine di ottenere un estratto enzimatico che conservasse attività vinilfenolo reduttasica per lo svolgimento dei diversi esperimenti; infatti, tale estratto enzimatico è stato dializzato ed in seguito si sono allestite delle biotrasformazioni utilizzando come substrato di riferimento il 4-vinilguaiacolo; la conversione di quest'ultimo a 4-etilguaiacolo è stata valutata sia in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), sia indirettamente allo spettrofotometro, rilevando l'ossidazione del cofattore NADH.

Dalle prove di rottura realizzate con sfere di vetro (dal diametro di 450-600 µm) e macchina Precellys™ si evidenzia che il congelamento delle cellule da sottoporre a rottura ha un ruolo significativo nell'efficienza di estrazione dell'attività reduttasica presente nell'estratto cellulare. La rottura cellulare mediante sonicazione non ha dato riscontri positivi; la rottura di cellule congelate operata con sfere di vetro sottoposte ad agitazione con vortex conduce a dati di attività spettrofotometrica confrontabili con quelli ottenuti con macchina Precellys. Il trattamento con zimoliasi, che ha preceduto il metodo di rottura con sfere di vetro, non migliora significativamente l'efficienza di rottura. In definitiva, la rottura con Precellys ha mostrato di essere efficace nell'estrazione dell'attività reduttasica presente nel contenuto cellulare ma non soddisfa le esigenze quantitative di estratto cellulare necessario per i protocolli di purificazione di VR. Il metodo di rottura utilizzato, pertanto, vede l'impiego di sfere di vetro agitate su vortex.

Sono state allestite delle prove per verificare la stabilità enzimatica di VR in un estratto cellulare grezzo e dializzato in seguito ad esposizione a diverse condizioni sperimentali di temperatura e di pH: non ci sono variazioni significative di attività dell'enzima mantenuto ai diversi pH, mentre gli effetti della temperatura sono visibili

nel lungo termine, in particolare su un estratto cellulare non dializzato, dove nel campione mantenuto a temperatura ambiente si misurano Unità enzimatiche residue inferiori rispetto alle temperature di conservazione di +4° e -20° C; si evidenzia inoltre che la dialisi dell'estratto cellulare conduce a dati di attività ($U\ ml^{-1}$) e di attività specifica ($U\ mg^{-1}\ proteine$) più elevati rispetto ad un estratto non dializzato, consentendo altresì una migliore conservazione nel tempo delle Unità enzimatiche ai diversi valori di temperatura e pH considerati.

Sono state sperimentate diverse metodiche cromatografiche su colonna allo scopo di purificare l'attività enzimatica oggetto di studio, partendo dall'estratto enzimatico grezzo dializzato proveniente da cellule (*Dekkera bruxellensis* CBS 4481) cresciute 48 ore in bioreattore. I protocolli di purificazione si basano sull'utilizzo di cromatografia ad interazione idrofobica (Phenyl sepharose), cromatografia d'affinità (resine Procion red e Cibacron blue, analoghi strutturali dei cofattori $NAD^+/NADH$ e $NADP^+/NADPH$) e cromatografia a scambio cationico debole (carbossimetilcellulosa).

Nella cromatografia ad interazione idrofobica (Phenyl sepharose), le proteine sono state eluite con concentrazioni decrescenti di solfato d'ammonio mentre nella cromatografia d'affinità e a scambio cationico debole le diverse frazioni sono state separate con concentrazioni crescenti di forza ionica (NaCl). In ogni esperienza cromatografica tutte le frazioni di eluizione sono state sottoposte a test spettrofotometrico.

La componente proteica delle frazioni di interesse, quindi con rilevante attività reduttasica, è stata valutata in elettroforesi in gel di poliacrilammide (metodo SDS-PAGE).

Nell'esperienza di purificazione con colonna cromatografica ad interazione idrofobica e cromatografia di affinità l'enzima di interesse non è stato adsorbito alla resina.

Nella cromatografia a scambio cationico l'attività reduttasica è rilevata in frazioni eluite ad una concentrazione di circa 0,5 M NaCl. Dal gel di elettroforesi delle frazioni di interesse si evidenziano diverse bande che potrebbero essere attribuite all'enzima studiato ma nessuna banda può essere definita tale inequivocabilmente. Questa prova di purificazione, benché efficiente, non ha soddisfatto gli scopi della

purificazione. Pertanto, tali frazioni così parzialmente purificate sono state riprese per essere sottoposte a dei passaggi successivi di purificazione ma il prosieguo di questa esperienza è stato compromesso da problemi di stabilità dell'enzima.

Considerate le difficoltà incontrate nel processo di purificazione, la caratterizzazione dell'enzima è realizzata su un estratto cellulare dializzato allo scopo di identificare i valori ottimali di pH, temperatura, nonché i parametri cinetici di Michaelis-Menten della VR nei confronti del substrato 4-vinilguaiacolo, in un estratto cellulare dializzato. Dai risultati ottenuti dalla caratterizzazione enzimatica si evince che l'enzima oggetto di studio, non purificato, manifesta un optimum di attività a pH 7 mentre l'optimum di temperatura è di 30 °C. La K_m apparente dell'enzima VR è 0,59 mM 4-vinilguaiacolo, mentre la V_{max} apparente è pari a 0,17 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$.

È stato effettuato uno screening su diversi estratti cellulari ottenuto ceppi vinari di *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* della collezione CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, The Netherlands), valutando allo spettrofotometro la capacità di VR di ridurre diversi derivati stirenici, allo scopo di valutare la specificità dell'enzima VR. Dai risultati si evince che, tra i substrati utilizzati, l'enzima presenta specificità solo nei confronti di 4-vinilguaiacolo, manifestando anche attività in presenza di acido ferulico. In quest'ultimo caso la reazione sarebbe possibile solo in seguito ad una decarbossilazione dell'acido idrossicinnamico per opera dell'enzima CD presente nell'estratto cellulare. Questa ipotesi può essere sostenuta dall'assenza di attività della VR in presenza del substrato acido ferulico metilestere, molto probabilmente perché la CD non possiede la capacità di convertire questa molecola nel vinile corrispondente.