

**Scuola di Dottorato in Scienze Molecolari e Biotecnologie Agrarie,
Alimentari ed Ambientali
Universita' degli Studi di Milano**

**Caratterizzazione molecolare, risposte a stress e attività
enzimatiche specifiche di ceppi vinari di
*Dekkera/Brettanomyces bruxellensis***

Tesi di Dottorato
Riassunto

Ileana Vigentini

2010-2011

Ad oggi, tra i lieviti responsabili dell'alterazione del vino, *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* è la specie più studiata. L'alterazione prodotta da *D./B. bruxellensis* è dovuta principalmente ai seguenti aspetti:

- ✓ essa rimane vitale nelle bevande che vengono conservate tramite l'impiego di estremi stress abiotici (anaerobiosi, fino al 12-13% di etanolo (v/v), minime quantità di zuccheri fermentabili);
- ✓ i trattamenti adottati (solfitazione, filtrazione a membrana, il trasferimento del vino in botti sterilizzate) non sempre sono efficaci;
- ✓ la produzione di composti dall'aroma sgradevole da *Brettanomyces* comprende i fenoli volatili.

Lo scopo di questo progetto di tesi di dottorato è stato di sviluppare strategie per l'analisi ed il controllo della presenza di *D./B. bruxellensis* nel vino.

Per quanto riguarda il primo punto, ossia l'analisi microbiologica dell'alterazione, il presente lavoro descrive:

- i) lo sviluppo di nuovi protocolli per il typing di *D./B. bruxellensis*;
- ii) la biodiversità fenotipica nella specie *D./B. bruxellensis*.

Il controllo dell'alterazione del vino si è basato su:

- iii) lo studio delle risposte di *D./B. bruxellensis* a condizioni di stress.

i) Studi sulla distribuzione e l'incidenza di questa specie sono riportati in letteratura; in particolare, essi suggeriscono un'elevata biodiversità dovuta alla fusione tra genomi oppure alla mancanza di uno stato sessuale. Poiché *D./B. bruxellensis* viene principalmente associato alle bevande fermentate, si ritiene che le condizioni ambientali estreme possano determinare il frequente riarrangiamento genico di *D./B. bruxellensis*. In *Saccharomyces cerevisiae*, il motivo intronico TACTAAC (ariat branch point) ed il suo sito in 5' di splicing GTATGT (5'ss) sono sequenze conservate e sono state utilizzate nella costruzione di primers per l'analisi "Intron Splice Site amplification" (ISS-PCR). Se da un lato la messa a punto di un protocollo per una multiplex PCR che impiega oligonucleotidi modificati proprio a livello del 5'ss -GTAAGT- ha confermato l'elevato polimorfismo esistente in *D. bruxellensis*, dall'altro una nuova serie ottimizzata di primers, un semplice protocollo di separazione elettroforetica capillare e chiare regole per l'elaborazione dei profili genetici ISS hanno permesso di evidenziare differenze genetiche che, fino ad ora, solo altre tecniche sofisticate, ma laboriose, potevano fare (cariotipo, RFLP-PFGE, AFLP, etc.). Inoltre, considerando che esiste una correlazione positiva tra il DNA non codificante e la complessità dei genomi eucariotici, i profili ISS rappresentano uno strumento per analizzare il tasso evolutivo di questa specie di lievito.

ii) I lieviti della specie *D./B. bruxellensis* hanno evoluto numerose opzioni di sviluppo al fine di sopravvivere ai cambiamenti dell'ambiente e distinti gruppi genetici possono avere diverse caratteristiche fisiologiche. L'obiettivo di questa attività è stato di caratterizzare una collezione di *D./B. bruxellensis*, aventi diversi profili genetici, dal punto di vista fenotipico studiando lo sviluppo del lievito e la produzione sia di fenoli volatili che di ammine biogene in un vino-modello. Inoltre, l'assimilazione delle fonti di carbonio, la produzione di H₂S e l'attività della vinilfenolo reduttasi (VFR) sono state valutate. I risultati confermano il carattere ceppo-dipendente di questa specie nel produrre fenoli volatili ed indicano che l'individuazione di ceppi a rapido sviluppo e con cinetiche di produzione di off-flavours elevate può dimostrarsi efficace per introdurre adeguate contromisure. Il 30% dei ceppi sotto analisi si dimostrava possedere un proprio profilo di assimilazione delle fonti di carbonio. Infine, una correlazione negativa tra l'attività della vinilfenolo reduttasi e la produzione di H₂S è stata osservata. Poiché si ipotizza che *D./B. bruxellensis* produca fenoli volatili per riequilibrare il potenziale redox e in *S. cerevisiae* la liberazione di H₂S avviene attraverso l'attività di una solfito reduttasi, è possibile che ceppi caratterizzati da basse attività della VFR sfruttino altri sistemi per riossidare il NADH, tra questi la riduzione dei solfiti.

iii) Un obiettivo dell'industria del vino è quello di ridurre il rischio iniziale di contaminazione. Durante questa attività è stato studiato l'effetto della corrente elettrica sulla sopravvivenza e sulla produzione di fenoli volatili in *D./B. bruxellensis* nel vino. I risultati hanno indicato che un simile effetto si verifica sia sulle cellule dopo il trattamento con la corrente e quelle esposte all'SO₂; infatti, entrambi i trattamenti hanno ridotto la sopravvivenza delle cellule. La cinetica di accumulo di fenoli volatili ha confermato che l'utilizzo di un campo elettrico potrebbe essere sufficiente per impedire l'alterazione del vino. Infine, questa è stata intrapresa lo studio degli effetti metabolici che si scatenano in *D./B. bruxellensis* a seguito dell'esposizione da SO₂. I dati suggeriscono che la via metabolica della prolina sia coinvolta nell'aumento di tolleranza all'anidride solforosa.

In conclusione, i principali prodotti della ricerca di questa tesi di dottorato sono stati:

- ✓ un nuovo protocollo di PCR per la tipizzazione di *D./B. bruxellensis* che usa sia primers specifici per questa specie di lievito che un sofisticato ed affidabile protocollo di separazione dei frammenti in elettroforesi capillare;
- ✓ la raccolta la correlazione di dati fenotipici di *D./B. bruxellensis* che non sono mai stati utilizzati per valutare il grado di biodiversità in questa specie, come ad esempio l'attività specifica della VPR, la produzione di H₂S;
- ✓ una nuova tecnologia per ridurre la sopravvivenza di *D. bruxellensis* nel vino grazie all'impiego di un trattamento a bassa corrente elettrica (LEC);
- ✓ la comprensione di alcuni dei meccanismi metabolici coinvolti nella risposta all'SO₂ in *D./B. bruxellensis*.