

# Screening dell'attività $\beta$ -glucosidasi in ceppi di *Saccharomyces* spp. isolati da mosto

Luciana De Vero<sup>1</sup>, Tommaso Bonciani<sup>2</sup>, Alexandra Verspohl<sup>1</sup>, Paolo Giudici<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Vita. Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia. Via Amendola, 2 - 42122 Reggio Emilia.

<sup>2</sup> AEB group, Brescia, Italia.

Email: [luciana.devero@unimore.it](mailto:luciana.devero@unimore.it)

## Introduzione

In enologia l'attività  $\beta$ -glucosidasi è un carattere di interesse, in quanto correlata al miglioramento dell'espressione aromatica dei vini. Infatti, questo enzima va ad agire sulla classe dei composti aromatici terpenici che si trovano sotto forma di coniugati  $\beta$ -glucosidici nelle varietà d'uva aromatiche, come Moscato e Gewürztraminer. L'attività  $\beta$ -glucosidasi nei lieviti aumenta il rilascio di terpeni presenti nelle uve, idrolizzando il legame chimico tra le molecole aromatiche e la parte saccaridica non volatile (Figura 1).

L'attività  $\beta$ -glucosidasi è stata ben caratterizzata nei ceppi *non-Saccharomyces* appartenenti ai generi *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniospora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Rosi et al 1994; Barbagallo et al., 2004). Al contrario, la presenza di questa attività enzimatica è stata raramente riscontrata nel genere *Saccharomyces* (Daenen et al, 2008).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di saggiare un pool di 75 ceppi di lievito, isolati da mosto d'uva refrigerato, appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*, per selezionare i ceppi dotati di attività  $\beta$ -glucosidasi (Tabella 1).

## Materiali e metodi

### Ceppi di lievito testati

Nel presente studio sono stati utilizzati 75 ceppi di lievito, depositati nella Unimore Microbial Culture Collection (UMCC, Reggio Emilia - [www.umcc.unimore.it](http://www.umcc.unimore.it)) e appartenenti alla specie *S. cerevisiae* (40 ceppi) e *S. uvarum* (35 ceppi) (Tabella 1). Il ceppo di *S. cerevisiae* AL41 è stato incluso nei test per la sua attività  $\beta$ -glucosidasi riportata da Spagna et al. (2002). Inoltre, il ceppo BS81 di *Wickerhamomyces anomalus* è stato utilizzato come controllo positivo per il dosaggio qualitativo e quantitativo della  $\beta$ -glucosidasi (Quatrini et al., 2008, Restuccia et al., 2011).

### Screening qualitativo con substrati cromogeni

L'attività  $\beta$ -glucosidasi dei ceppi è stata valutata mediante screening qualitativo in piastre contenenti un terreno addizionato con uno dei due diversi substrati cromogeni, arbutina o esculina, come riportato da Bonciani et al. (2018). La formazione di pigmenti bruno-nerastri da arbutina ed esculina, prodotta dai ceppi con attività  $\beta$ -glucosidasi, è stata valutata dopo 5 giorni di incubazione a 27°C. Lo screening è stato eseguito con tre repliche biologiche per ogni ceppo.

### Screening quantitativo per l'attività della $\beta$ -glucosidasi

I ceppi positivi allo screening qualitativo con entrambi i substrati cromogeni, che mostravano un evidente alone scuro, sono stati inclusi nel test quantitativo della  $\beta$ -glucosidasi. L'attività enzimatica è stata valutata rilevando l'idrolisi del substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranoside (p-NPG), che produce glucosio e p-nitrofenolo, una sostanza pigmentata che può essere misurata spettrofotometricamente in presenza di sodio carbonato (Spagna et al., 2002, Restuccia et al., 2011). La misura è stata eseguita su tre diversi preparati cellulari incluso il compartimento extracellulare, i lisati cellulari e le cellule intere, secondo il protocollo riportato in Bonciani et al. (2018). Le misure sono state effettuate in triplo per ogni ceppo (Figura 2).

## Risultati

Lo screening qualitativo dell'attività  $\beta$ -glucosidasi con arbutina ed esculina ha evidenziato un diverso livello di discriminazione. Infatti, lo screening con esculina ha dato il 75% dei risultati positivi, mentre lo screening con l'arbutina solo il 39% (Tabella 1). Tra i ceppi testati, in totale 12 hanno mostrato attività  $\beta$ -glucosidasi: 11 ceppi appartengono alla specie *S. uvarum* (B2EN2, VA42, VA44, CRY11, CRY14, CRY24, CRYB4, CRYC1, GRAS11, GRAS13, GRAS14) e 1 appartiene alla specie *S. cerevisiae* (IperR). Tutti i ceppi selezionati hanno mostrato attività nelle frazioni di cellule intere (Figura 2), mentre nessuna attività rilevante è stata rilevata nei lisati cellulari e nei fluidi extracellulari.

### Tabella 1. Ceppi di lievito testati e screening qualitativo della loro attività $\beta$ -glucosidasi con substrati cromogeni.

\* In grassetto sono riportati i ceppi selezionati per lo screening quantitativo della  $\beta$ -glucosidasi via p-NPG assay.

† Produzione di un pigmento bruno-nerastro:

+++ = alone molto scuro; ++ = evidente alone scuro; + = moderato alone; - = nessun alone.

Specie	Codice ceppo*	Riferimenti bibliografici	Screening dell'attività $\beta$ -glucosidasi†		
			Idrolisi dell'Arbutina	Idrolisi dell'Esculina	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CRY21; CRY22; UMCC 2540; UMCC 2542; UMCC 2543; UMCC 2544; UMCC 2554; UMCC 2557; UMCC 2558; UMCC 2562; UMCC 2564; UMCC 2565; UMCC 2566; UMCC 2567; UMCC 2568; UMCC 2570; UMCC 2571	Verspohl et al. 2017	-	++	
	UMCC 2541; UMCC 2552; UMCC 2555; UMCC 2556; UMCC 2559; UMCC 2560; UMCC 2561		+	++	
	UMCC 2545; UMCC 2546; UMCC 2547; UMCC 2548; UMCC 2549; UMCC 2550; UMCC 2551; UMCC 2553; UMCC 2563; UMCC 2569		-	-	
	6167.3A		-	++	
	AL41	Spagna et al. 2002	+	++	
	21T2	Mezzetti et al. 2014; Bonciani et al. 2018	+	++	
	4003	Giudici et al. 1997	+	++	
	3002		-	++	
	2001.6B	Solieri et al. 2015	-	++	
	IperR	Bonciani et al. 2016	++	++	
	<i>Saccharomyces uvarum</i>	B2EN2; VA42; VA44; CRY11; CRY14; CRY24; CRYB4; CRYC1; GRAS11; GRAS13; GRAS14	Verspohl et al. 2017	++	++
		B2EN3; VA12; VA14; CRYA1; CRYA4; CRYC3; CRYC4		-	-
		B2EN4; CRY13; CRYB1; CRYB2; CRYB3; GRAS12; GRAS21; GRAS23		+	++
		VA11; VA41; CRY12; CRYA2; CRYC2; GRAS22; GRAS24		-	++
VA13; CRYA3			+	-	
BS81		Quatrini et al. 2008; Restuccia et al. 2011	+++	+++	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>					

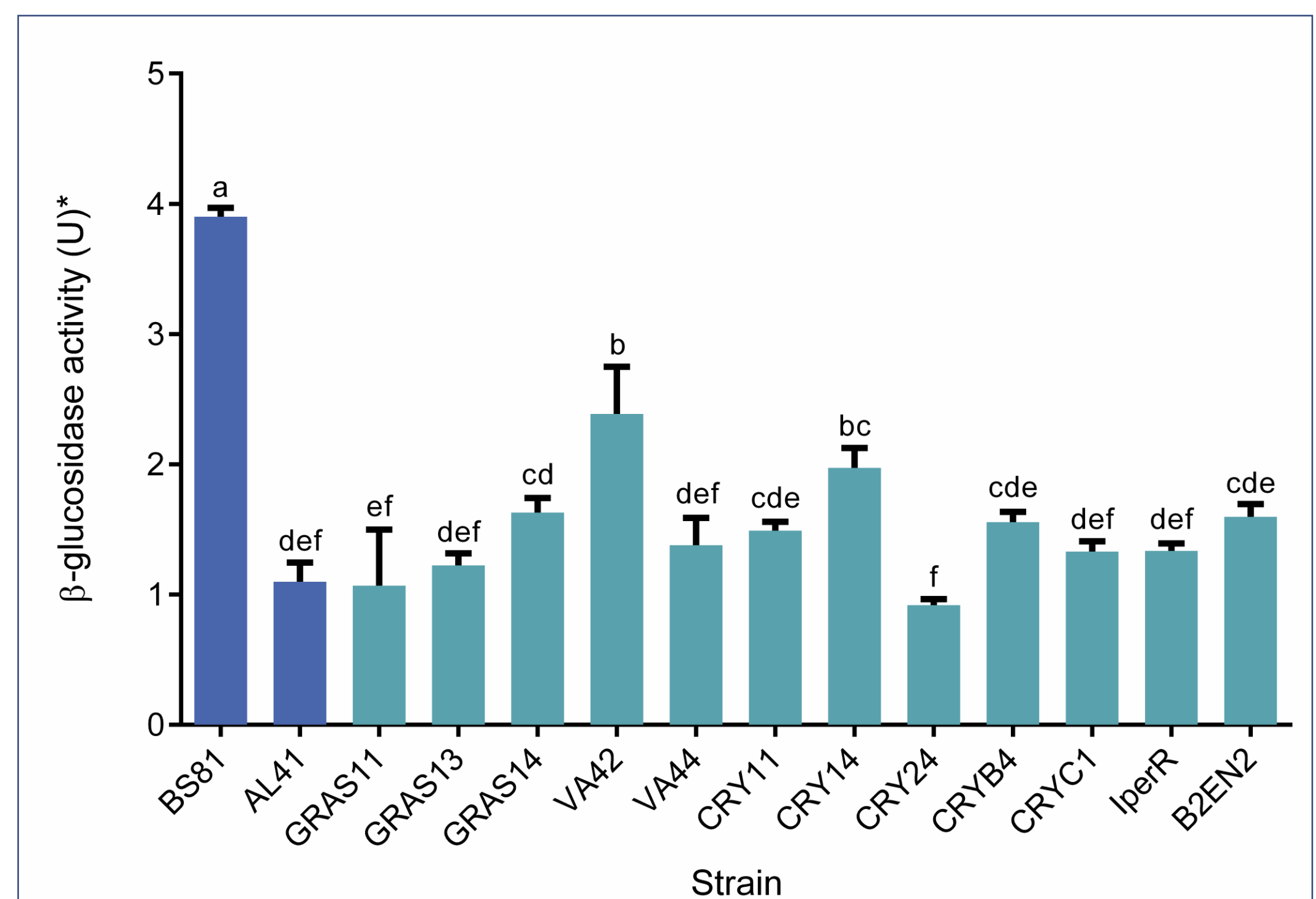
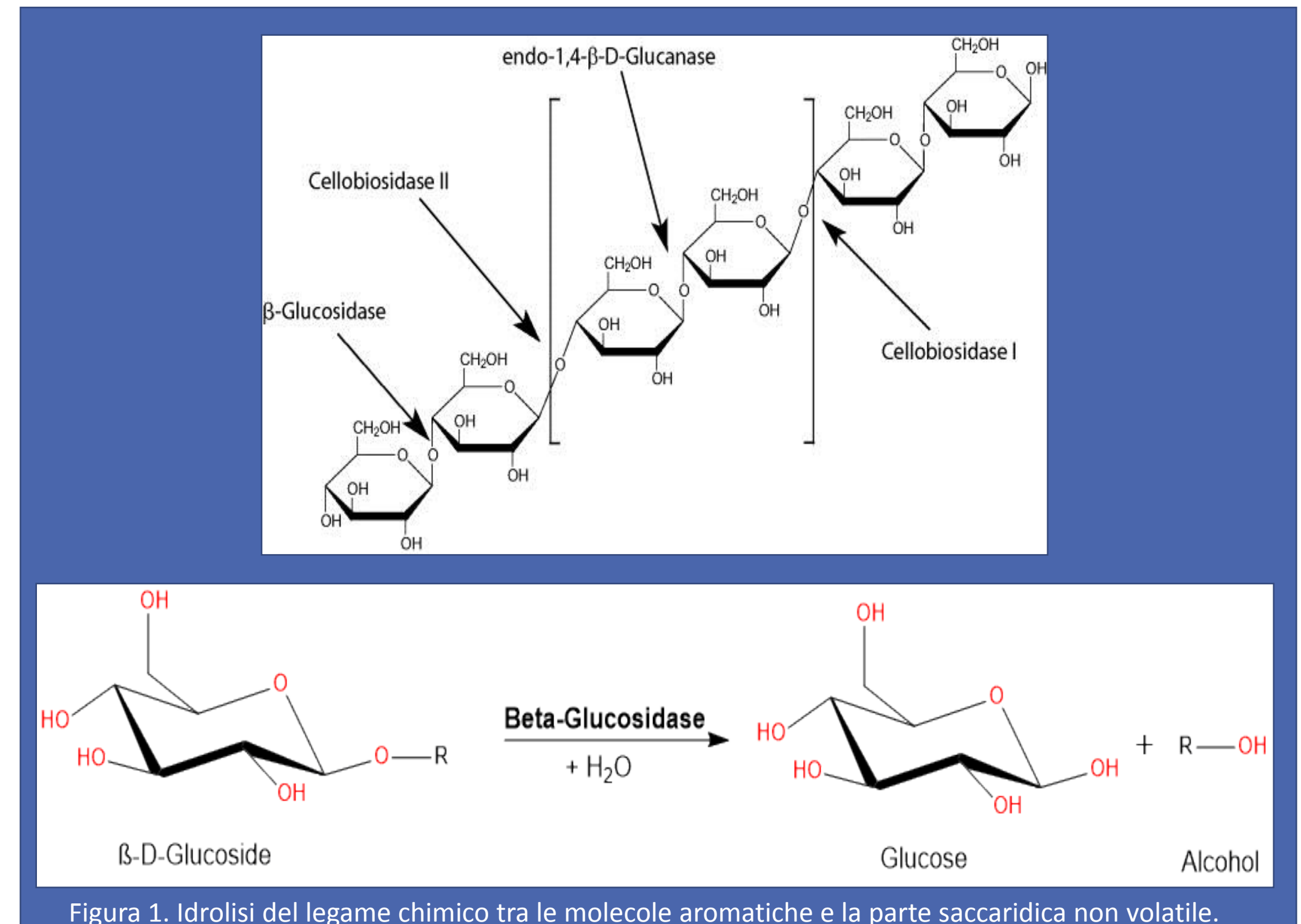


Figura 2. Attività  $\beta$ -glucosidasi espressa nelle cellule dei ceppi selezionati.

\* Un'unità (U) di attività enzimatica è definita come la quantità di  $\beta$ -glucosidasi che rilascia 1 nmol di p-nitrofenolo (p-NP) al minuto. L'attività è stata standardizzata per  $10^7$  cellule  $\text{ml}^{-1}$ . I ceppi BS81 e AL41 sono stati usati come riferimento.

Le lettere in apice indicano l'appartenenza ai gruppi omogenei come determinato dall'analisi della varianza con il test post-Hoc HSD di Tukey ( $P < 0,05$ ). Il sottogruppo "a" contiene alti valori di attività enzimatica mentre il sottogruppo "f" contiene bassi valori di attività.

## Conclusioni

La nostra indagine preliminare ha confermato che l'attività  $\beta$ -glucosidasi è poco presente nella specie *S. cerevisiae* mentre vi è una marcata tendenza della specie *S. uvarum* a idrolizzare i legami  $\beta$ -glucosidici. In particolare, i ceppi *S. uvarum* CRY14, VA42 e GRAS14 sono risultati quelli con la più alta attività  $\beta$ -glucosidasi. I tre ceppi selezionati possono essere sfruttati direttamente in vinificazione per la loro potenziale capacità di migliorare i profili aromatici del vino o inseriti in programmi di miglioramento genetico. Inoltre, potrebbero essere potenziali fonti per la produzione commerciale di enzimi da applicare in vinificazione. Più in generale, lo studio apre un nuovo e promettente campo di ricerca dell'attività  $\beta$ -glucosidasi in ceppi appartenenti alla specie *S. uvarum*, fin'ora poco esplorata.

### Riferimenti bibliografici

- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R., Restuccia, C. and Giudici, P. (2004) Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from moulds and yeasts employable for enological applications. *Enzyme Microb Technol* 35, 58–66.
- Bonciani, T., Solieri, L., De Vero, L. and Giudici, P. (2016) Improved wine yeasts by direct mating and selection under stressful fermentative conditions. *Eur Food Res Technol* 242, 899–910.
- Bonciani, T., De Vero, L., Giannuzzi, E., Verspohl, A., Giudici, P. (2018) Qualitative and quantitative screening of the  $\beta$ -glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* strains isolated from refrigerated must. *Lett Appl Microbiol*. doi: 10.1111/lam.12891.
- Daenen, L., Saison, D., Sterck, F., Delvaux, F.R., Verachtert, H. and Derdelinckx, G. (2008) Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J Appl Microbiol* 104, 478–488.
- Giudici, P., Restuccia, C., Randazzo, C., Melia, V. and Corte, V. (1997) Biodiversità fenotipica di lieviti isolati da mosti e vini siciliani. *Industrie delle Bevande* 26, 252–259.
- Mezzetti, F., De Vero, L. and Giudici, P. (2014) Evolved *Saccharomyces cerevisiae* wine strains with enhanced glutathione production obtained by an evolution-based strategy. *FEMS Yeast Res* 14, 977–987.
- Quatrini, P., Marino, S., Puglia, A.M., Restuccia, C., Caggia, C., Randazzo, C.L., Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R. and Giudici, P. (2008) Partial sequencing of the  $\beta$ -glucosidase-encoding gene of yeast strains isolated from musts and wines. *Ann Microbiol* 58, 503–508.
- Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C.L., Caggia, C. and Spagna, G. (2011) An alkaline  $\beta$ -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Res* 11, 487–493.
- Rosi, I., Vinella, M. and Domizio, P. (1994) Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J Appl Microbiol* 77, 519–527.
- Solieri, L., Verspohl, A., Bonciani, T., Caggia, C. and Giudici, P. (2015) Fast method for identifying inter- and intra- species *Saccharomyces* hybrids in extensive genetic improvement programs based on yeast breeding. *J Appl Microbiol* 119, 149–161.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C. and Giudici, P. (2002) Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enzyme Microb Technol* 31, 1030–1035.
- Verspohl, A., Solieri, L. and Giudici, P. (2017) Exploration of genetic and phenotypic diversity within *Saccharomyces uvarum* for driving strain improvement in winemaking. *Appl Microbiol Biotechnol* 101, 2507–2521.