



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



# $\beta$ -Glucosidasas de cepas nativas y su potencial en la liberación de aromas en vinos. Desarrollo de nuevas estrategias para su uso en la industria enológica.

Tesis presentada para la obtención de título del

Doctorado en Química

Por: Lic. Stefani de Ovalle

Directoras:

Dra. Paula González Pombo

Dra. Beatriz M. Brena

Área Bioquímica, Facultad de Química, Udelar



Área Bioquímica  
DEPBIO





## AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis es fruto del esfuerzo y sacrificio de años de trabajo, de superar obstáculos, de celebrar las buenas y de transitar muchas emociones. Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo y la colaboración de muchas personas que han formado parte del mismo.

Quiero agradecer a mis tutoras, a Paula, por haber confiado en mí desde el inicio, por haberme brindado su apoyo durante todo el trabajo no solo guiándome y aconsejándome desde lo académico sino también en lo emocional, celebrando las buenas y acompañándome en los momentos difíciles. A Bea, por haber aceptado acompañarme en este camino, por su exigencia académica que me ha ayudado a mejorar y a cuestionarme todo. A las dos, gracias!

A las agencias que hicieron posible que este trabajo sea desarrollado con un respaldo económico. Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Área Química. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de maestría. A la Comisión Académica de Posgrado (CAP) de la UdelaR por las becas de doctorado y de finalización. A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto de iniciación a la investigación.

A Laura Fariña del Laboratorio de Biotecnología de Aromas del CYTAL de la Facultad de Química por los análisis de volátiles por GC-MS.

A Madelon Portela de la Unidad de Bioquímica y Proteómicas Análíticas del Institut Pasteur de Montevideo por los análisis de espectrometría de masas de proteína y por las horas dedicadas a ayudarme.

A Lorena Bentancor de la Universidad ORT por enseñarme las técnicas de inmovilización en nanopartículas de Sílica.

A Ana y Andrea, por haberme orientado en aprender sobre biología molecular, por las charlas, por los consejos y sobre todo por ser tan compañeras. A Juliette Dourron y Carolina Croci con quienes tuve el gusto de transitar ese camino.

A todos mis compañeros del Área Bioquímica: Batista, Carmen, Ceci G, Gabi I, Karen, Laura, Miriam y Pablo por las horas de trabajo compartidas y la buena onda.

A Agus, Ceci P, Gabi P y Lari, por el compañerismo, las charlas, las reuniones, las risas, los chistes.

A mis amigas de Facultad de Ciencias, Anita, Ceci, Chicho y Jeni, las hermanas que me regaló esa casa de estudios.

A mis suegros, mi cuñado Diego y al abuelo Carlos, por ser tan compañeros conmigo en este proceso, siempre al pendiente y colaborando en todo lo que estaba a su alcance.

A mis sobrinos Cris, Jorgito, Jeni, Mia y Emma; piezas fundamentales de mi vida que me acompañan en cada paso.

A mis padres y hermanos, porque siempre me incentivaron, siempre apostaron a que yo podía lograr todo lo que me propusiera, desde caminar y hablar, hasta doctorarme. Siempre han estado allí, para agarrarme si me caía y para celebrarme si lo lograba. Gracias, no tengo palabras.

A mi esposo Alex, por compartir conmigo cada día, por motivarme siempre, impulsarme a alcanzar mis objetivos, por ser tan compañero, por su amor, sus abrazos, sus palabras de apoyo. Gracias amor!

A todos, no me alcanzan las palabras para expresar lo agradecida y dichosa que me siento. Gracias.

# INDICE

ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>17</b>
PANORÁMICA ACTUAL Y DESAFÍOS DE LA VITICULTURA EN URUGUAY.....	17
ROL DE LA MICROBIOTA DE LA UVA EN VINIFICACIÓN .....	18
Levaduras .....	19
Bacterias lácticas.....	20
Bacterias acéticas.....	20
Hongos filamentosos.....	21
AROMAS.....	22
Los aromas del vino se originan en las diferentes etapas de la vinificación .....	22
Los precursores glicosídicos constituyen un reservorio de aromas varietales.....	23
La química de las agliconas y las notas asociadas son diversas.....	24
La hidrólisis ácida de los precursores glicosilados no es específica.....	29
La hidrólisis de los precursores mediada por glicosidasas es más selectiva .....	30
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE BGLs.....	31
Clasificación de BGLs .....	31
Se han descrito dos mecanismos de catálisis de hidrólisis del enlace glucosídico mediado por BGLs: retención e inversión .....	32
Inhibición de BGLs microbianas por glucosa y etanol.....	34
BGLs EN AMBIENTES ENOLÓGICOS.....	35
PRODUCCIÓN DE ENZIMAS .....	39
La optimización de la producción es clave para la obtención de enzimas microbianas a nivel industrial.....	39
La producción de proteínas recombinantes es una estrategia económica para la producción de enzimas de interés .....	40
INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.....	41
El uso de enzimas inmovilizadas en la industria es creciente.....	41
Existe una amplia variedad de soportes y metodologías para inmovilización de enzimas.....	42
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
ANTECEDENTES Y ESTRATEGIA DE TRABAJO .....	45
OBJETIVOS.....	47
Generales.....	47

Específicos .....	47
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA SELECCIÓN DE LAS CEPAS.....	48
Mantenimiento de las cepas .....	48
Selección en placa .....	48
Curvas de crecimiento y producción de BGL .....	48
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE BGLs .....	49
Cuantificación de la actividad BGL.....	49
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	50
Electroforesis de proteínas en Phast System .....	50
Cuantificación de proteínas.....	51
Obtención del extracto enzimático.....	51
Purificación por intercambio aniónico .....	51
Determinación de la masa molecular .....	52
Actividad en presencia de metales .....	52
Determinación de condiciones óptimas de pH y temperatura.....	53
Determinación de parámetros cinéticos .....	53
Actividad y estabilidad en condiciones enológicas .....	53
Especificidad frente a sustratos sintéticos y naturales .....	53
Inmovilización de BGL .....	54
Desorción de la enzima (leakage) de las NPs de sílica .....	56
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS .....	57
Tratamientos enzimáticos de vinos .....	57
Extracción de glicósidos y volátiles .....	57
Análisis y cuantificación de compuestos volátiles .....	58
Determinación del índice Glicosil-Glucosa (G-G).....	59
Determinación del Valor de Actividad Odorante (VAO).....	60
Evaluación por panel de expertos.....	60
Actividad de las enzimas inmovilizadas frente a glucósidos de antocianinas de vinos tintos .....	61
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA OPTIMIZAR PRODUCCIÓN DE BGL.....	62
Cultivos Erlenmeyer en diferentes medios nutrientes.....	62
Condiciones de cultivos en Erlenmeyer .....	62
Condiciones de cultivo en biorreactores.....	63
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA EXPRESIÓN DE BGL .....	64

Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	64
Purificación de material genético .....	64
Cuantificación del material genético .....	64
Secuenciación de productos .....	64
Propagación de productos en <i>E. coli</i> DH5α o XL-1 .....	64
Minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps) .....	65
Identificación de la secuencia codificante BGL <i>I. terricola</i> .....	66
Co-transformación de <i>S. cerevisiae</i> T73-4 .....	70
Transformación de <i>S. cerevisiae</i> T73-4 con vectores de expresión .....	74
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
4.1 CEPAS NATIVAS PRODUCTORAS DE ACTIVIDAD BGL .....	77
Producción de actividad BGL en placa .....	78
Cinética del crecimiento y producción de BGL <i>I. orientalis</i> TE11-19F e <i>I. terricola</i> PV10-69F .....	79
4.2 PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE BGL <i>I. ORIENTALIS</i> ..	82
Inmovilización de enzimas en nanopartículas (NPs) de sílica biomimética .....	84
Purificación de BGL <i>I. orientalis</i> .....	87
Masa molecular y punto isoeléctrico .....	88
Actividad en presencia de metales .....	88
Actividad y estabilidad en condiciones enológicas .....	89
Inmovilización de BGL <i>I. orientalis</i> y caracterización de la enzima inmovilizada...	93
Estudio de liberación de la enzima el medio .....	95
Caracterización de BGL <i>I. orientalis</i> inmovilizada .....	96
4.3 ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE BGLs DE CEPAS NATIVAS .....	99
Especificidad de enzimas BGLs .....	99
Relevancia del estudio de la especificidad de BGLs en vinos .....	101
Breve reseña de las variedades de vinos utilizados en este trabajo .....	102
Umbrales de percepción y valor de actividad odorante (VAO) .....	103
Especificidad hacia sustratos sintéticos y naturales .....	105
Actividad y especificidad sobre glicósidos de vinos .....	107
Valores de Actividad Odorante (VAOs) determinados en los tratamientos de vinos tintos .....	115
Evaluación sensorial de los tratamientos de vinos tintos .....	117
Evaluación del posible reuso de los biocatalizadores inmovilizados .....	118
4.4 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BGL <i>I. TERRICOLA</i> .....	120

La composición del medio nutriente es clave para la inducción de actividad BGL .....	120
Los cultivos <i>batch</i> alimentado permiten controlar la velocidad específica de crecimiento y la cantidad de producto .....	121
Efecto de medios nutrientes en el crecimiento y la cinética de producción de BGL .....	123
Efecto de Temperatura y pH en el crecimiento y cinética de producción de BGL	125
Escalado de la producción de BGL <i>I. terricola</i> en biorreactores .....	127
4.5 EXPRESIÓN DE BGL <i>I. TERRICOLA</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i> .....	131
Organismos genéticamente modificados: definición y normativas vigentes .....	131
Producción recombinante de BGLs en <i>Saccharomyces</i> .....	132
Obtención de secuencias parciales de la proteína.....	135
Amplificación de fragmentos parciales del gen de la BGL por PCR .....	138
Amplificación de la secuencia codificante una vez conocida la secuencia .....	142
Estrategias de generación de una cepa de <i>S. cerevisiae</i> para la expresión de la BGL g>4180 .....	144
Expresión de BGL g>4180 de <i>I. terricola</i> .....	147
<b>5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>149</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>151</b>
<b>7. PUBLICACIONES .....</b>	<b>173</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>174</b>
Vectores para el clonado de productos de PCR.....	174
Vectores para clonado de productos de fusión.....	176
Secuencias .....	178



## ABREVIATURAS

4-MUG	4-metilumberifenil- $\beta$ -D-glucósido
Abs	Absorbancia
ACT1p	Promotor de Actina de <i>S. cerevisiae</i>
ADH1p	Promotor de Alcohol Deshidrogenasa 1 de <i>S. cerevisiae</i>
ADHp::BGL::CYCt	Producto de fusión de promotor ACT1p, BGL <i>I. terricola</i> y terminador CYCt
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADNg	ADN genómico
ARNasa A	Ribonucleasa A
BGL	$\beta$ -glucosidasa
BGL <i>I. orientalis</i>	BGL de <i>I. orientalis</i> TE11-19F
BGL <i>I. terricola</i>	BGL de <i>I. terricola</i> 0621
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTp	BLAST de proteínas
CSM	Complete Supplement Mixture
CYCt	Terminador Citocromo C de <i>S. cerevisiae</i>
EGA	Medio de cultivo Agar Esculina
ENDpBGL	Promotor endógeno y BGL <i>I. terricola</i>
ENDpBGL::CYCt	Producto de fusión de promotor ENDpBGL, BGL <i>I. terricola</i> y terminador CYCt
FML	Fermentación maloláctica
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas
G-G	índice Glicosil-Glucosa

i.i.	intercambio iónico
IEF-PAGE	Electroforesis de Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida
kcat	Número de recambio
kcat/Km	Constante de especificidad
Km	Constante Michaeliana
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MALDI-TOF MS/MS	Desorción/ionización láser asistida por matriz detector time of flight acoplada a espectrometría de masas en tándem
MANAE-Agarosa	gel Mono-amino-etil-N-amino-etil agarosa
NATIVE-PAGE	Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next generation sequencing
NPs	Nanopartículas
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pESC-URA-ADHpBGL	Producto de fusión ADHp::BGL::CYCt clonado en pESC-URA
pESC-URA-ENDpBGL	Producto de fusión ENDpBGL::CYCt clonado en pESC-URA
pI	Punto isoeléctrico
pNP	p-nitrofenol
pNPG	p-nitrofenil-β-D-glucósido
SDA ura-	Medio Sabouraud Dextrose Agar sin Uracilo
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida

SPE	Extracción en Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i>
UE	Unidad de enzima
URA3	Gen de Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa de <i>S. cerevisiae</i>
VAO	Valor de Actividad Odorante
V <sub>máx</sub>	Velocidad máxima
YNB	Base nitrogenada de levaduras ( <i>yeast nitrogen base</i> )
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y glucosa
YPG	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y glicerol

## RESUMEN

Uruguay es un país vitivinícola, productor desde mediados del siglo XVII y ha sido reconocido internacionalmente con premiaciones y distinciones por su excelencia en calidad. Uno de los desafíos para el crecimiento del sector es la producción de vinos con características distintivas, competitivos para el mercado internacional. Actualmente, existe una tendencia a explorar y utilizar el potencial de la microbiota silvestre nativa en el proceso de elaboración de vinos, para aportar atributos que contribuyan a la calidad del producto. Algunos de estos atributos están asociados a productos generados por reacciones enzimáticas, por lo que la búsqueda y estudio de nuevas enzimas con propiedades específicas es muy interesante.

Las  $\beta$ -glucosidasas (BGLs) son enzimas capaces de hidrolizar precursores glicosídicos de aromas que permanecen después de finalizada la fermentación y que constituyen una reserva potencial de aroma. Es extremadamente difícil encontrar variantes de estas enzimas que sean activas y estables en las condiciones de estrés enológico, como son las elevadas concentraciones de glucosa del mosto (~100 g/L), etanol en vinos (~12 % v/v), valores de pH ácidos (3.0-4.0), entre otras. En este trabajo, el primer abordaje fue seleccionar cepas nativas *no-Saccharomyces* de ambientes vínicos (Colección del Laboratorio de Enología de la Facultad de Química) capaces de producir actividad BGL a pH 4.0. Además de la cepa de referencia *Issatchenkia terricola* 0621, se destacaron en la producción de actividad BGL a este pH, las cepas *I. terricola* PV10-69F e *Issatchenkia orientalis* TE11-19F. Considerando que no se habían reportado estudios de caracterización de BGLs de *I. orientalis*, en esta tesis se purificó y caracterizó dicha enzima. Para su aplicación en vinos, la enzima fue estabilizada mediante inmovilización en nanopartículas de sílica y posterior entrecruzamiento con glutaraldehído. La actividad y especificidad de la enzima sobre precursores glicosídicos aislados de vino Moscatel blanco, estudiada en vino sintético, demostró un incremento significativo de terpenos, norisoprenoides y fenoles volátiles. Sin embargo, su aplicación directa en vinos no mostró actividad sobre los precursores de agliconas

aromáticas, lo que podría deberse a una baja estabilidad en esta matriz, ya que perdió 100% de su actividad al final del proceso.

En cambio, la BGL de la cepa de *I. terricola* 0621 fue activa en todos los vinos estudiados. Esta BGL hidrolizó precursores de tipo norisoprenoides (vomifoliol y 3-oxo- $\alpha$ -ionol) y algunos terpenos tales como cis-8-hidroxilinalool (Tannat y Moscatel) y geraniol (en Tannat). Los estudios sensoriales indicaron que los descriptores encontrados por el panel sensorial se correspondían con los resultados obtenidos mediante GC-MS. Es así que las notas destacadas a frutos secos y miel, característicos de norisoprenoides, concordaron con el análisis mediante GC-MS. El vino tratado con la enzima BGL *I. terricola* se distinguió incluso frente a los vinos tratados con la preparación comercial de glicosidasas de *A. niger*, con notas que los evaluadores calificaron como más agradables.

Estos resultados obtenidos con la BGL *I. terricola* representan un hito en cuanto a la liberación de aromas en vinos. Sin embargo, la baja producción constitutiva de la enzima es una limitante para la aplicación enológica. Por lo tanto, se optimizaron las condiciones para la producción de la enzima, modificando los medios de cultivo nutrientes. En cultivos *batch* en Erlenmeyer, se logró el incremento de la producción de la enzima al doble en comparación a las condiciones utilizadas de rutina, y el proceso fue escalado a biorreactores en cultivos de tipo *batch* y *batch* alimentado. Si bien se logró mejorar la producción de actividad BGL, los resultados fueron insuficientes como para permitir una aplicación industrial. Por lo tanto, a continuación se abordaron estrategias de clonado y expresión de la enzima para viabilizar su uso.

Visto que el genoma de *I. terricola* no se encontraba secuenciado, el primer abordaje fue el diseño de cebadores degenerados a partir de fragmentos peptídicos obtenidos del análisis de espectrometría de masas de la proteína pura. Mediante esa estrategia no fue posible hallar fragmentos coincidentes con BGLs reportadas en base de datos. A continuación, en el marco del proyecto FMV\_1\_2017\_1\_136574 se identificó la secuencia codificante, lo que permitió el clonado y su expresión en la cepa T73-4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta cepa

representa una alternativa muy promisoría para la producción de BGL *I. terricola*.

## ABSTRACT

Uruguay is a wine producer country since the middle of the seventeenth century and has been internationally recognized with awards and distinctions for its excellence in quality. One of the challenges for the sector growth is the production of distinctive wines, competitive for the international market. The use of natural wild microbiota in the winemaking process provide attributes that contribute to product quality. Since some products responsible of these attributes are generated by enzymatic reactions, the search of specific enzymatic activities is very interesting.

The  $\beta$ -glucosidases (BGLs) are enzymes capable of hydrolyzing glycoside precursors, a potential aroma reserve which remains after the end of the fermentation. It is extremely difficult to find variants of these enzymes active and stable under oenological stress conditions, such as high concentrations of glucose in must ( $\sim 100$  g/L), ethanol in wines ( $\sim 12\%$  v/v), acidic pH (3.0-4.0), and others. In this work, the first approach was the use of native yeast strains selected from wine environments, capable of producing BGL activity at pH 4.0. This study was carried out on non-*Saccharomyces* native yeasts (Collection of the Oenology Laboratory of the Faculty of Chemistry). *Issatchenkia terricola* PV10-69F and *Issatchenkia orientalis* TE11-19F stood out in the production of BGL activity at pH 4.0, in addition to the reference strain *I. terricola* 0621. Considering that no characterization studies of *I. orientalis* BGLs had been reported before, in this thesis the enzyme was purified and characterized. For its application in wines, the enzyme was stabilized by immobilization on silica nanoparticles and subsequent crosslinking with glutaraldehyde. The immobilized enzyme showed an increase in volatile terpenes, norisoprenoids and phenols on glycoside precursors isolated from white Muscat wine, in synthetic wine. However, the enzyme was not active in wines, probably due to the loss of 100% of its activity at the end of the process

In contrast, the BGL of the *I. terricola* 0621 strain was active in all the wines studied. The enzyme hydrolyzed norisoprenoid-type precursors (vomifoliol and 3-oxo- $\alpha$ -ionol) and some terpenes such as cis-8-hydroxylinalool (Tannat and Muscat)

and geraniol (in Tannat). The descriptors found by the sensory panel corresponded to the results obtained by GC-MS. Thus, the outstanding notes of nuts and honey, characteristic of norisoprenoids, agreed with GC-MS analysis. Wine treated with the BGL *I. terricola* enzyme stood out even compared to wines treated with the commercial preparation of *A. niger* glycosidases, with notes that the evaluators rated as more pleasant.

These results obtained with the BGL of *I. terricola* represent a milestone in terms of the release of aromas in wines. However, the low constitutive production of the enzyme is a limitation for its oenological application. Thus, conditions of enzyme production were optimized by modifying nutrient culture media. Enzyme production was increased twice, compared to the routinely conditions, and the process was scaled up to bioreactors in batch and fed batch cultures. It was possible to improve the production of BGL activity, however, the results were still insufficient to allow an industrial application. Therefore, cloning and expression strategies were addressed subsequently, to optimize production and make its use feasible.

Given that the genome of *I. terricola* was not sequenced, the first approach was the design of degenerate primers from peptide fragments obtained from the mass spectrometry analysis from the pure protein. Unfortunately, it was not possible to find fragments coinciding with BGLs reported in the database, using this strategy. Next, the coding sequence for BGL was identified. Later, in the context of FMV\_1\_2017\_1\_136574 project, the coding sequence was identified, which resulted in the cloning and its expression in the *Saccharomyces cerevisiae* T73-4 strain. This strain represents a very promising alternative for the production of BGL *I. terricola*.



## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### **PANORÁMICA ACTUAL Y DESAFÍOS DE LA VITICULTURA EN URUGUAY**

El vino es una de las bebidas fermentadas más antiguas que se conoce, registros arqueológicos confirmaron que su producción y consumo comenzó, como mínimo, en el año 5400 a.C. (Lamuela-Raventós & Andres-Lacueva, 2004; Piqueras, 2014). La cosecha, despalillado, estrujado y prensado de la uva, seguido de la fermentación alcohólica, crianza en barricas, clarificación, embotellado (y reserva) son el conjunto de etapas que conllevan a la obtención de esta bebida, lo que se conoce globalmente como proceso de vinificación (Robinson; 2006). Las características del producto final dependen de varios factores vinculados a estas etapas, entre los cuales, uno de los más influyentes sin dudas, es la calidad de la uva. El clima juega un rol sumamente importante ya que incide en la composición química del fruto así como en la diversidad de microorganismos presentes, lo que tendrá un impacto en la calidad del vino (Cioch-Skoneczny, Satora, Skotniczny, & Skoneczny, 2018).

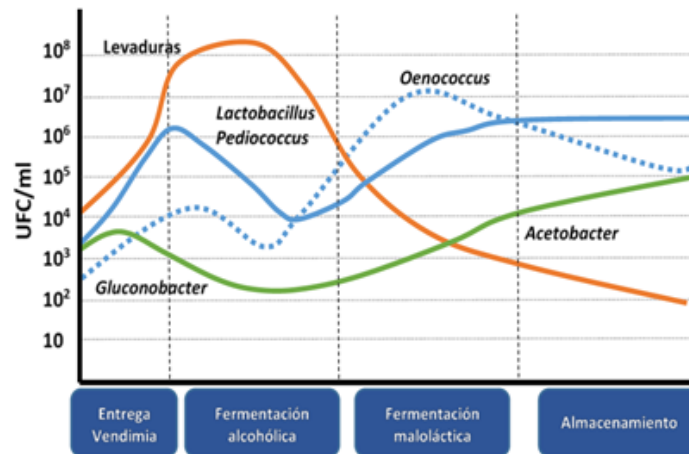
Uruguay es productor de vinos desde mediados del siglo XVII y actualmente, son diversas las variedades de vid plantadas que dan lugar a la producción de vinos en este país. Las variedades de uvas blancas más comunes son Sauvignon blanc, Chardonnay y Moscatel mientras que en tintas se encuentran Merlot, Cabernet Sauvignon y principalmente Tannat (Berreta Curi et al., 2008). Si bien en la última década la exportación de vinos se ha incrementado y Uruguay ha sido reconocido internacionalmente con premiaciones y distinciones por su excelencia en calidad, un gran número de bodegas tienen como principal objetivo abastecer únicamente el mercado interno. Por lo tanto, uno de los desafíos actuales es la obtención de vinos de calidad competitivos para el mercado internacional (Uruguay XXI, 2015). La investigación en el área de enología es sin lugar a dudas, un pilar fundamental para consolidar y desarrollar el sector. En el año 2001 se publicó un artículo sobre las líneas de investigación hacia el futuro, de interés para el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INAVI). Entre estas se encontraban:

evaluación de la capacidad antioxidante en vinos, incidencia del manejo del viñedo en vinos, contaminación por *Botrytis sp.*, el estudio de clones de Tannat, la incidencia de las nuevas tecnologías en vinificación y la caracterización analítica de los vinos uruguayos (Zunino, 2001). Actualmente existe además, un interés creciente en conocer la microbiota nativa y sus aportes a las características de los vinos, algo que se logra mediante la exploración de la microbiota silvestre nativa (Andorrà et al., 2019; Ciani et al., 2016; Garofalo et al., 2018).

## **ROL DE LA MICROBIOTA DE LA UVA EN VINIFICACIÓN**

En el proceso de transformación de mosto en vino intervienen múltiples géneros y especies, cuyo metabolismo contribuye a la composición química y propiedades del vino. El estudio de las características metabólicas de los microorganismos permite predecir el impacto en la presencia y abundancia de ciertos metabolitos en el vino como glicerol, esteres, entre otros (Belda et al., 2017; Hierro, González, Mas, & Guillamán, 2006). Para el conocimiento de esta diversidad microbiana tradicionalmente se han utilizado métodos conocidos como “de primera generación” basados en técnicas de aislamiento directo en uvas y mostos, estudios de parámetros fisiológicos (morfología, metabolismo de nutrientes, etc.) y la identificación molecular de las cepas aisladas. Otra alternativa es el uso de métodos de secuenciación de alto rendimiento, conocidos conjuntamente como secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés “*Next Generation Sequencing*”). A diferencia de los de primera generación, los NGS permiten comparar y analizar no solo aquellos organismos que son capaces de crecer en determinadas condiciones de cultivo sino a toda la comunidad microbiana en conjunto, su diversidad, abundancia y genes funcionales, lo que ha incrementado el conocimiento de las especies presentes (Morgan, du Toit, & Setati, 2017). La microbiota de la uva está compuesta por levaduras, bacterias lácticas y acéticas y en ocasiones, por hongos filamentosos (Romano, Ciani, & Fleet, 2015). En la **Figura 1.1** se muestra la evolución de la población de levaduras y de bacterias lácticas y acéticas, durante el proceso de vinificación. En la fermentación alcohólica predomina el crecimiento de las cepas de levaduras más resistentes al alcohol y al bajo pH. Al finalizar esta etapa las levaduras mueren y

se liberan los nutrientes al medio, lo que conlleva al crecimiento de bacterias lácticas, principalmente de *Oenococcus oeni*, que puede conducir la fermentación maloláctica (FML). De manera similar, la población de bacterias acéticas se incrementa al finalizar la fermentación alcohólica (Fernández Pérez, 2015).



**Figura 1.1** Dinámica poblacional y de evolución de microorganismos del vino: levaduras, bacterias lácticas y acéticas, presentes durante el proceso de vinificación y crianza. Extraído de Fernández Pérez (2015), Tesis Doctoral.

## Levaduras

El estudio de levaduras en enología se ha centrado durante varios años en *Saccharomyces cerevisiae* debido a su relevancia en la fermentación alcohólica. Sin embargo, tanto el uso de técnicas de aislamiento directo como el de métodos NGS, han demostrado que en uvas la presencia de *S. cerevisiae* es baja o rara. Debido a que las diferentes especies que se encuentran en un hábitat pueden ser autóctonas (las que son componentes esenciales de la comunidad) o alóctonas (las que son transitorias o por casualidad), la baja frecuencia ( $\leq 1\%$ ) de *S. cerevisiae* en uvas planteó un debate sobre su origen (Barata & Loureiro, 2012; Jolly, Augustyn, & Pretorius, 2006). Más del 99% de las especies de levaduras presentes en el fruto y durante las primeras fases de la fermentación son no-*Saccharomyces*. Durante la vinificación, la población de estas especies persiste hasta que *S. cerevisiae* se impone y las desplaza. Es importante destacar que varias levaduras no-*Saccharomyces* han demostrado ser productoras de metabolitos que

aportan atributos al vino (glicerol, ésteres, etc.). En los últimos años mediante el uso en fermentaciones secuenciales o mixtas, se ha demostrado la importancia del estudio de estas especies y su rol en la elaboración de vinos, ya que permiten aportar caracteres distintivos al producto y complejidad aromática (Shi, Wang, Chen, & Zhang, 2019). Las fermentaciones mixtas con inóculos de cepas nativas son una alternativa para favorecer el desarrollo de determinadas características en el producto final. Como desventaja, el proceso es difícil de controlar ya que el predominio de una cepa se encuentra muy influenciado por la competencia por los nutrientes del mosto, la liberación de factores *killer*, entre otros.

### **Bacterias lácticas**

Las bacterias lácticas, son las encargadas de llevar a cabo la FML: la bioconversión de ácido málico en ácido láctico. Este proceso bioquímico ocurre una vez finalizada la fermentación alcohólica y tiene consecuencias directas en el vino ya que disminuye la acidez del mismo a la vez que modifica el sabor (Husnik, Delaquis, Cliff, & Van Vuuren, 2007). Se han identificado varias especies de bacterias lácticas productoras de actividades enzimáticas relevantes para la industria enológica (Mesas, Rodríguez & Alegre, 2011; Michlmayr et al., 2010). *Oenococcus oeni* es la especie más estudiada y considerada como la mejor adaptada a las condiciones del vino (Bartowsky, Henschke, Høj, & Pretorius, 2004; Boido et al., 2009).

### **Bacterias acéticas**

Las bacterias acéticas incrementan la acidez volátil (ácido acético), dando como resultado un producto “avinagrado”. Estas bacterias son microorganismos oxidativos, capaces de oxidar el etanol del vino a ácido acético. Si bien son diversos los géneros identificados en la vid que pueden realizar esta biotransformación, *Glucanobacter* es el que se ha identificado con mayor frecuencia. La presencia y el crecimiento de bacterias del ácido acético se asocia al deterioro del vino debido al incremento en la acidez volátil (Barata & Loureiro, 2012).

## Hongos filamentosos

Algunas especies de hongos filamentosos pueden desarrollarse sobre vides dañadas, causando alteraciones importantes en la calidad de las uvas. Los hongos filamentosos en uvas son diversos siendo los géneros más comunes: *Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Mucor* (Kačániová et al., 2019). Varias especies han sido identificadas y asociadas a defectos del vino, por ejemplo *Botrytis cinerea*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, incrementan la acidez volátil debido a la producción de ácido acético. Los hongos filamentosos son también causantes de la contaminación por micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por algunas de estas especies. Las más estudiadas son producidas principalmente por *Aspergillus* (aflatoxina, ocratoxina A), *Fusarium* (toxina T-2, deoxynivalenol) y *Penicillium* (ocratoxina A, patulina). La presencia de micotoxinas representa un problema grave y recurrente en todo el mundo, que puede provocar problemas de salud y pérdidas económicas. Por otro lado, algunos hongos filamentosos pueden estimular el crecimiento de *S. cerevisiae* y por lo tanto, promover la fermentación alcohólica (Romano et al., 2015).

En resumen, dado que los distintos microorganismos que forman parte de la vid contribuyen directamente a la calidad del vino, su estudio es una fuente fundamental para la innovación enológica. Esto permite seleccionar los microorganismos que pueden mejorar la calidad del vino, así como identificar aquéllos que provocan defectos en el producto.

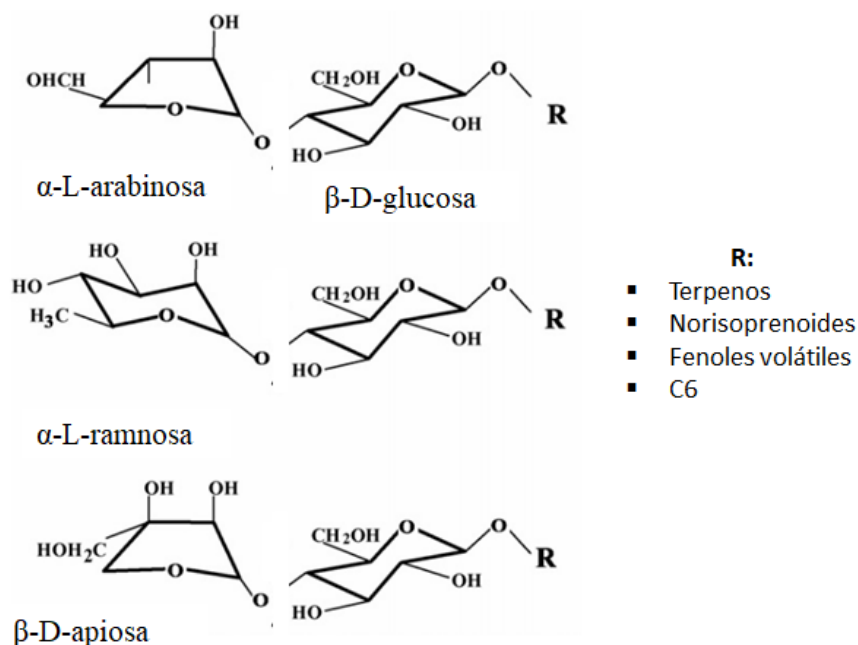
## AROMAS

### **Los aromas del vino se originan en las diferentes etapas de la vinificación**

El aroma del vino es el resultado de la composición de compuestos volátiles odorantes que aparecen durante el complejo proceso de vinificación. Constituye sin lugar a dudas, uno de los parámetros más importantes que contribuye a la calidad y valor de esta bebida. Los compuestos volátiles aromáticos se clasifican según su origen en primarios, pre-fermentativos, fermentativos y post-fermentativos (Cruelles Borrull, 2012; García Gallego, 2008). Los aromas primarios son aquellos que vienen determinados genéticamente según la variedad de la vid por lo que se conocen más comúnmente como “varietales”. El clima, las prácticas vitivinícolas, la región del viñedo, entre otras, pueden afectar la cantidad y variabilidad de estos compuestos. Los aromas pre-fermentativos se forman durante los procesos comprendidos desde la cosecha de la uva hasta el inicio de la fermentación (prensado, estrujado). En estos procesos se favorece la acción de oxigenasas, enzimas cuyos principales sustratos son los ácidos linoleico y linolénico. Los compuestos resultantes son principalmente alcoholes y aldehídos. Los aromas fermentativos son producidos principalmente por el metabolismo de las levaduras (fermentación alcohólica) y en ocasiones por bacterias lácticas (durante la FML). Los compuestos que se forman son alcoholes, ésteres, compuestos carbonílicos y azufrados, lactonas y fenoles. Por último, los aromas post-fermentativos aparecen como resultado de reacciones químicas que ocurren durante el proceso de crianza y/o reserva del vino. Durante el proceso de crianza del vino, algunos compuestos presentes en el vino reaccionan con la madera de la barrica por lo que, los aromas resultantes dependerán de la variedad del vino y del tipo de madera componente de la barrica. En el caso de la reserva en botella, se dan reacciones químicas entre el vino y el corcho. En ambos procesos, además de la evolución de los aromas, se modifica el sabor y el color del vino (Belda et al., 2017; González Pombo, 2010; Escudero & Ferreira, 2013).

## Los precursores glicosídicos constituyen un reservorio de aromas varietales

Los aromas varietales se destacan frente a los otros tipos por estar directamente relacionados a la variedad de uva utilizada, permitiendo identificar incluso la procedencia de un vino, las características del suelo, el tipo de uvas con el que se ha elaborado, entre otras. En mostos y vinos, además de las formas libres volátiles, estos aromas se encuentran en forma ligada a azúcares (precursores glicosídicos) o conjugados cisteínilados, siendo los glicósidos los más abundantes (Darriet, Thibon, & Dubourdiou, 2012). En la **Figura 1.2** se esquematiza la estructura general de los precursores di-glicosídicos compuestos por: el monosacárido de  $\alpha$ -L-arabinosa,  $\alpha$ -L-ramnosa o  $\beta$ -D-apiosa unido (mediante enlace o-glicosídico) a una molécula de  $\beta$ -D-glucosa, la cual está unida un grupo -R (potencial aromático). Estos precursores se pueden clasificar en tres grupos según el azúcar en: 6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosídeos, 6-O- $\beta$ -D-apiofuranosil- $\beta$ -D-glucopiranosídeos y 6-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosídeos (Ugliano, 2009).



**Figura 1.2** Estructuras químicas de precursores glicosídicos encontrados en uva. Adaptado de Palmieri & Spagna, 2007

En cuanto a los grupos –R (agliconas), los terpenos se encuentran en forma glicosilada en una proporción elevada y fueron los primeros en ser descritos. Estudios posteriores demostraron que además, otros compuestos aromáticos también se encuentran presentes como precursores. Estos son: C13-norisoprenoides, fenoles volátiles, fenoles aromáticos, compuestos C6, alcoholes alifáticos, ácidos alifáticos, derivados bencénicos y ácidos fenólicos, entre otros. En la **Tabla 1.1** se mencionan las principales agliconas encontradas en mostos y vinos (Liu, Zhu, Ullah, & Tao, 2017).

**Tabla 1.1** Principales agliconas encontradas en mostos y vinos.

Categoría	Compuesto
Terpenos	Óxidos de linalool, linalool, $\alpha$ -terpineol, $\beta$ -citronellol, nerol, terpinen-4-ol, limoneno, geraniol, ácido geránico, citronellol, farnesol, nerolidol, epoxylinalool.
C13-norisoprenoides	3-hidroxy- $\beta$ -damascenona, $\alpha$ -ionona, $\beta$ -ionona, $\beta$ -damascenona, 3-oxo- $\alpha$ -ionol, vomifoliol, 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN).
Fenoles volátiles	2,6-dimetoxifenol, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 2-metoxi-4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol, m-cresol, guaiacol, 4-vinilfenol
Fenoles aromáticos	eugenol, isoeugenol, siringol, 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído
C6	1-hexanol, trans-3-hexen-1-ol, trans-2-hexen-1-ol, cis-3-hexen-1-ol, trans-2-hexenal, hexanal, ácido hexanoico
Alcoholes alifáticos	1-octanol, 3-metil-2-butanol, isobutanol, alcohol isoamílico, 1-Butanol, 3-pentanol, 2-pentanol, 2-heptanol
Ácidos alifáticos	ácido acético, ácido octanoico, ácido isobutírico, ácido butanoico, ácido isovalérico, ácido cáprico
Compuestos bencénicos	2-feniletanol, ácido benzoico, benzaldehído, fenilacetaldéhído, alcohol bencílico, alcohol de anís
Derivados de ácido fenólico	metil-vanillato, etil-vanillato, vanillilacetona, vanillina, metil salicilato, alcohol dihidroconiferílico, acetovanillona

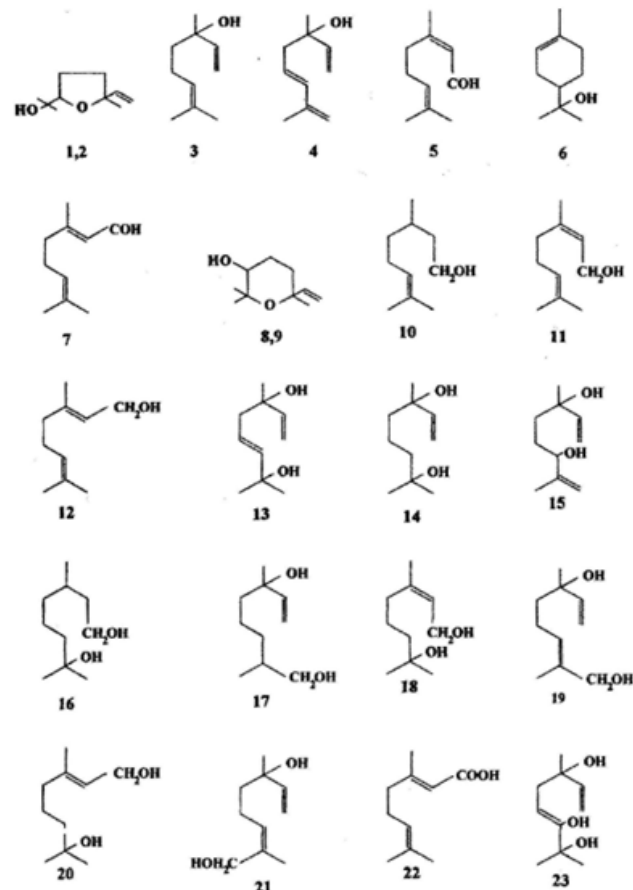
## La química de las agliconas y las notas asociadas son diversas

### *Los terpenos son característicos de la variedad*

Los monoterpenos del vino, son un grupo de compuestos aromáticos que están asociados a notas de flores, semillas, cítricos y frutales. Químicamente, los



terpenos presentan un esqueleto de carbono distintivo que consiste en una unidad básica de isopreno de cinco carbonos (2-metil-1,3-butadieno). Generalmente están compuestos por dos, tres, cuatro o seis unidades de isopreno de cinco carbonos, clasificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, respectivamente. Los terpenos pueden contener una variedad de grupos funcionales, muchos contienen grupos hidroxilo, por lo que son alcoholes terpénicos y algunos otros son cetonas. Durante el añejamiento del vino, el tipo y la proporción de terpenos pueden cambiar considerablemente. Una de esas transformaciones es la oxidación de los alcoholes monoterpénicos a óxidos de terpenos que tienen un éter cíclico, además de la estructura isoprenoide básica (Mateo & Jiménez, 2000; Jackson, 2014). Estos óxidos tienen umbrales de percepción 10 veces más altos que sus precursores (Rodríguez-Bencomo, Selli, Muñoz-González, Martín-Álvarez, & Pozo-Bayón, 2013). Durante el añejamiento, los terpenos pueden ser liberados mediante hidrólisis ácida a partir de sus precursores glicosídicos y en ocasiones, ocurren modificaciones en sus estructuras: algunos se vuelven cíclicos y forman lactonas, mientras que otros se transforman en cetonas (Jackson, 2014). Según la concentración de compuestos terpénicos en las bayas de uvas de *Vitis vinifera*, se clasifican como variedades terpénicas aquellas cuyo contenido es mayor o igual a 6mg/L por ejemplo, uvas de Moscatel. Riesling, es otra variedad similar a Moscatel, que se caracteriza por su elevado contenido de monoterpenos (Michlmayr et al., 2012). Aquellas cuyo contenido en monoterpenos está en el rango de 1 a 4 mg/L se las clasifica como “otras variedades”. Por último, se consideran variedades neutras aquellas cuyo contenido terpénico es menor o igual a 1 mg/L (Liu et al., 2017). En la **Figura 1.3** se muestran los principales terpenos encontrados en mostos y vinos.

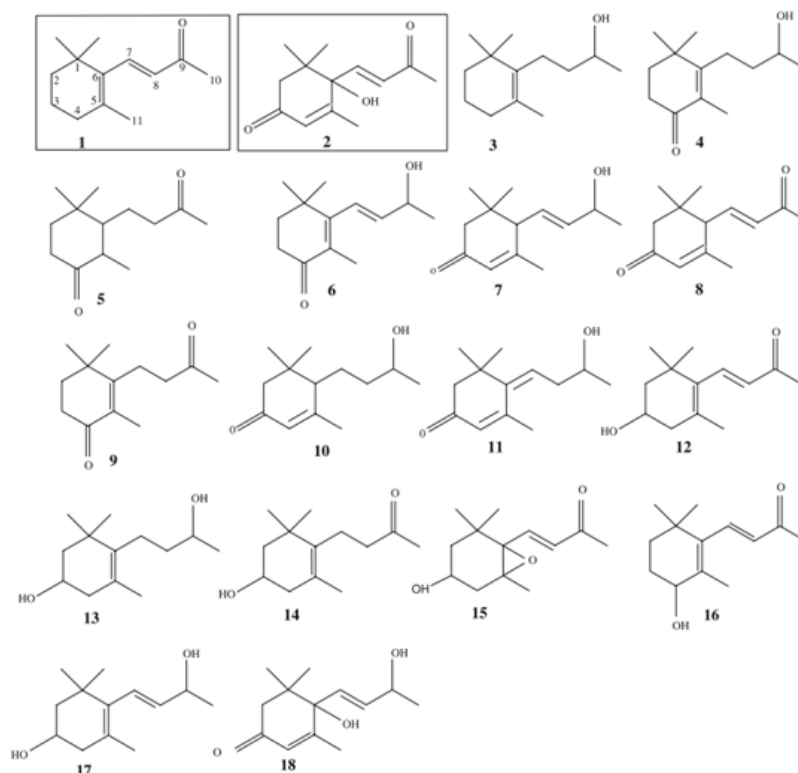


**Figura 1.3.** Se muestran las estructuras de los terpenos más frecuentemente encontrados en mostos y vinos. 1; 2; 8; y 9 óxidos de linalool; 3 linalool; 4 Ho-trienol; 5 neral, 6  $\alpha$ -terpineol, 7 geranial, 10 citronelol, 11 nerol, 12 geraniol, 13, 15 dioles, 14, endiol, 16 hidroxicitronelol, 17 8-hidroxi-dihidro-linalol, 18 hidroxinerol, 19 8- hidroxilinalol, 20 hidroxigeraniol, 21 8-hidroxilinalol, 22 ácido geránico, 23 triol. Adaptado de Arévalo-Villena, 2006.

### *Los C13 norisoprenoides de uvas son monoglucósidos*

Los C13 norisoprenoides son componentes del potencial aromático de la uva que derivan de los carotenoides mediante reacciones enzimáticas regioespecíficas (oxigenasas, reductasas, glicosiltransferasas) lo que explica que los productos predominantes sean de 13 átomos de Carbono (Mathieu, Wirth, Sauvage, Lepoutre, Baumes & Gunata, 2009; Mendes-Pinto, 2009). A diferencia de los terpenos, los C13 norisoprenoides se encuentran totalmente glicosilados en la uva bajo la forma de monoglucósidos y se encuentran en concentraciones similares en todas las variedades de uva (Mateo & Jiménez, 2000). Algunos

norisoprenoides contribuyentes al aroma se forman mediante modificaciones químicas como es el caso de la (E)- $\beta$ -damascenona, a partir de una cetona intermedia que proviene de la descomposición de la neoxantina (Wang, Zhang, Li, & Xu, 2013). Otros son liberados de sus precursores glicosilados por hidrólisis enzimática como por ejemplo el caso del 3-oxo- $\alpha$ -ionol y la 3-hidroxy- $\beta$ -damascenona (Cabaroğlu, Selli, Canbas, Lepoutre, & Günata, 2003). En la **Figura 1.4** se muestran las estructuras agliconas de los C13 norisoprenoides encontrados en uvas y vinos.



**Figura 1.4.** Estructuras químicas de los norisoprenoides detectados en uvas y vinos. 1)  $\beta$ -ionona, y 2) dehidrovomifoliol. Los restantes son derivados de los primeros. 3) 7,8-Dihidro- $\beta$ -ionol, 4) 4-Oxo-7,8-dihidro- $\beta$ -ionol, 5) Megastigman-4,9-diona, 6) 4-oxo- $\beta$ -ionol, 7) 3-Oxo- $\alpha$ -ionol, 8) 3-Oxo- $\alpha$ -ionona 9) 4-Oxo-7,8-dihidro- $\beta$ -ionona 10) 3-Oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol 11) 3-Oxo-retro- $\alpha$ -ionol, 12) 3-hidroxy- $\beta$ -ionona 13) 3-Hidroxy-7,8-dihidro- $\beta$ -ionol , 14) 3-Hidroxy-7,8-dihidro- $\beta$ -ionona 15) 3-Hidroxy-5,6-epoxy- $\beta$ -ionona 16) 4-Hidroxy- $\beta$ -ionona, 17) 3-Hidroxy- $\beta$ -ionol, 18) Vomifoliol. Adaptado de Mathieu et al, 2009.

### ***La contribución aromática de los fenoles volátiles depende de su origen***

Algunos vinilfenoles aparecen durante la fermentación alcohólica, debido a la descarboxilación de los ácidos fenólicos cumárico y ferúlico. Otros, tales como 4-etilfenol y 4-etilguaiacol, pueden aparecer durante el añejamiento en barricas de madera. Guaiacol, syringol, m-cresol, 2-feniletanol, 4-vinilguaicol, son propios de la uva y aparecen bajo forma ligada (conjugados a glucósidos) por lo que son considerados precursores de aromas varietales (Boido, Fariña, Carrau, Dellacassa, & Cozzolino, 2013; Parker et al., 2012). Algunos estudios sugieren que algunas glicosidasas pueden incrementar la concentración de fenoles volátiles lo que en ocasiones representa un impacto en el aroma del vino (Fia, Olivier, Cavaglioni, Canuti, & Zanoni, 2016; Parker et al., 2012). En general los vinilfenoles se asocian a notas especiadas (Francis & Newton, 2005) mientras que los etilfenoles mayoritariamente provienen de la conversión de hidroxycinamatos principalmente por levaduras del género *Brettanomyces* y se asocian con aromas desagradables de tipo animal, sudoración o farmacéutico (Woolfit, Rozpedowska, Piskur, & Wolfe, 2007).

### ***La contribución de los compuestos C6 es controversial***

El impacto de los compuestos C6 en el aroma del vino no ha sido tan estudiado como el de los terpenos y norisoprenoides. Sin embargo, se sabe que numerosos alcoholes C6 se encuentran bajo forma de precursores glicosilados y constituyen una reserva de aroma varietal (Moreno-Arribas & Polo, 2009). Los alcoholes C6 pueden formarse enzimáticamente por deshidrogenación de aldehídos C6 a partir de los ácidos linolénico y linoleico presentes en las uvas, siendo los más frecuentes 1-hexanol, cis-3-hexen-1-ol, trans-3-hexen-1-ol, cis-2-hexen-1-ol y trans-2-hexen-1-ol (Oliveira, Oliveira, Baumes, & Maia, 1998). La composición en el fruto es dependiente de la variedad, de la disponibilidad de las enzimas implicadas en la síntesis y del estado de madurez de la uva (Boido et al., 2003; Sánchez Palomo, Díaz-Maroto Hidalgo, González-Viñas, Pérez-Coello; 2005). Las notas asociadas a los alcoholes C6 son de tipo herbáceas, tales como “pasto

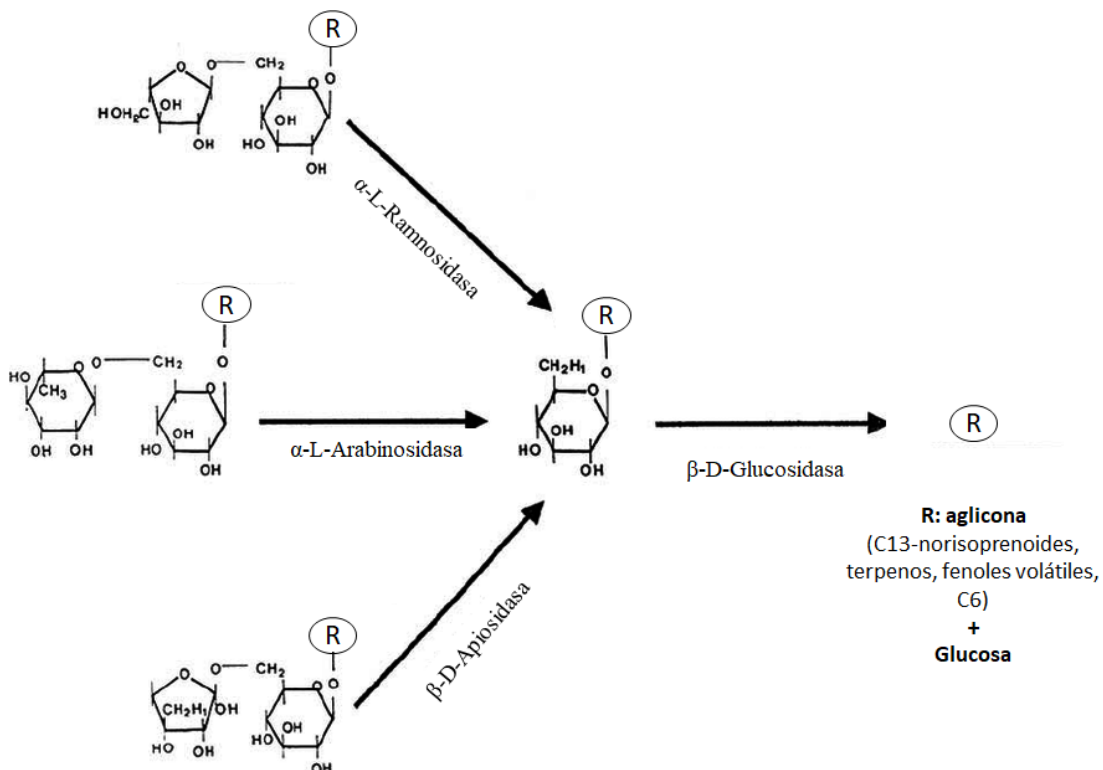
recién cortado” (Fariña et al., 2015; Bindon et al., 2014). Si bien algunos autores describen estas notas como desagradables, se sabe que su contribución está estrechamente asociada a la concentración en la que estos se encuentran (Ugliano & Henschke, 2009).

### **La hidrólisis ácida de los precursores glicosilados no es específica**

Durante todo el proceso de elaboración del vino, la mayoría de los precursores glicosilados permanecen intactos, constituyendo un reservorio de compuestos aromáticos que pueden ser liberados mediante hidrólisis (Sarry & Gunata, 2004). La liberación de las agliconas a partir de sus precursores glicosilados puede darse mediante hidrólisis ácida o enzimática. La primera, ocurre por las propias condiciones ácidas del proceso de vinificación, principalmente durante el añejamiento y la reserva en botella (Makhotkina & Kilmartin, 2012; Schneider, Razungles, Augier, & Baumes, 2001). El pH ácido del vino (pH 3.0-4.0) favorece la hidrólisis química del enlace glicosídico, ocasionando la liberación de los compuestos aromáticos. Estudios tanto en jugo de uva como en vinos han demostrado que la hidrólisis ácida modifica la estructura de las agliconas y que el patrón de modificación es dependiente del pH (Maicas & Mateo, 2005). En general, el impacto de las reacciones conducidas en las condiciones ácidas del vino genera controversias. Algunos autores sostienen que los rearrreglos moleculares pueden conllevar a aromas desagradables y otros consideran que el perfil aromático alcanzado en estas etapas puede asociarse directamente a un vino añejado (Loscos, Hernández-Orte, Cacho, & Ferreira, 2010). De todas maneras es claro que la hidrólisis ácida no es selectiva, ya que conlleva a la liberación de todas o la mayoría de las agliconas volátiles (Salinas et al., 2012).

## La hidrólisis de los precursores mediada por glicosidasas es más selectiva

La alta especificidad y capacidad catalítica de las enzimas permite la liberación selectiva de las agliconas sin ocasionar alteraciones estructurales, y de esta manera posibilita el desarrollo de un aroma más natural y distintivo (Singhania, Patel, Sukumaran, Larroche, & Pandey, 2013; Ugliano, 2009). La hidrólisis de los glicósidos disacáridos es secuencial y en dos pasos (Bayonove, 1988). En el primero, el enlace inter-azúcar se escinde por una exo-glicosidasa lo que lleva a la liberación del azúcar ( $\alpha$ -L-ramnosa,  $\alpha$ -L-arabionosa o  $\beta$ -D-apiosa) y los correspondientes  $\beta$ -D-glucósidos. Por último, las BGLs hidrolizan la unión entre una molécula de glucosa y el sustituyente sobre el carbono anomérico, lo que da lugar a la liberación de la aglicona (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5** Hidrólisis de precursores glicósidos por enzimas glicosidasas. En la primera etapa enzimas di-glicosidasas ( $\alpha$ -L-arabinosidasa,  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -D-apiosidasa) conllevan la ruptura del enlace inter-azúcares. A continuación, el  $\beta$ -D-glucósido resultante es sustrato de la enzima  $\beta$ -glucosidasa que rompe el enlace  $\beta(1\rightarrow4)$  liberando la aglicona libre y glucosa.

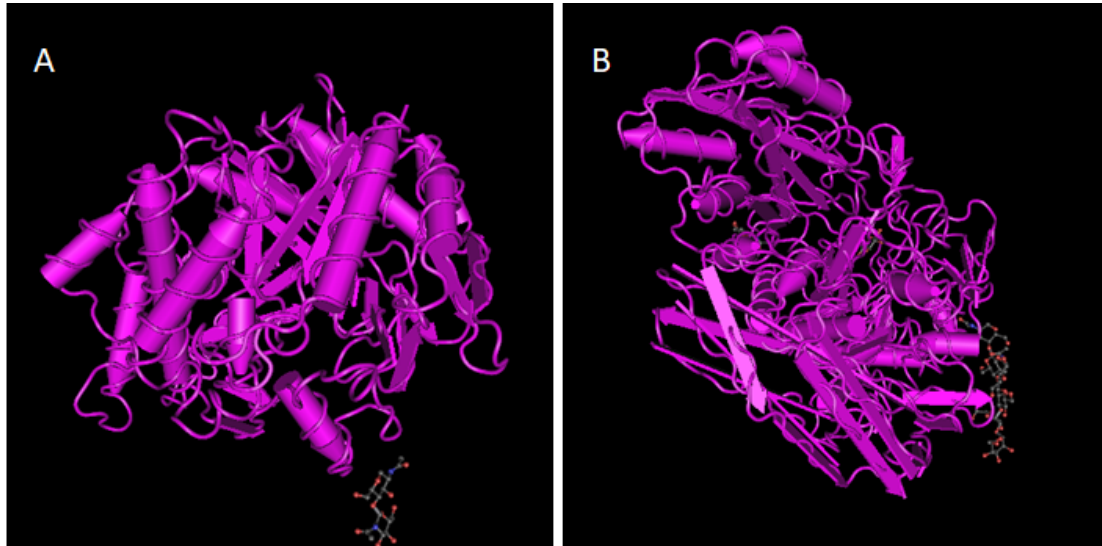
Se sabe que las exo-glicosidasas son muy específicas para el primer azúcar (ramnosa, arabinosa, etc.), pero bastante promiscuas para el segundo, siendo capaces incluso de aceptar moléculas no glicosídicas (Mazzaferro & Breccia, 2011). Las glicosidasas propias de las uvas se inhiben por las condiciones de vinificación y la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* que dominan la fermentación son poco productoras de estas actividades. Por lo tanto, no es posible hidrolizar el total de los precursores glicosídicos presentes en el mosto, durante el proceso de vinificación por lo que, para una liberación más eficiente de las agliconas a partir de estos precursores, será necesaria la adición de estas actividades en forma exógena (González-Pombo, Fariña, Carrau, Batista-Viera, & Brena, 2014; Mateo & Jiménez, 2000). Dado que una elevada fracción de precursores que permanece durante el proceso de vinificación, se encuentran como  $\beta$ -D-glucósidos, el uso de BGLs en la industria del vino es potencialmente muy interesante porque puede promover la liberación de los compuestos aromáticos a partir de los precursores glucosídicos no odorantes (Baffi et al., 2013; González-Pombo et al., 2014; Swangkeaw, Vichitphan, Butzke, & Vichitphan, 2011).

## CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE BGLs

### Clasificación de BGLs

Las BGLs ( $\beta$ -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21), enzimas ampliamente distribuidas en todos los organismos tanto procariotas como eucariotas, catalizan la remoción de glucosa a partir de sacáridos y glucósidos. Al presente se han descrito 133 familias de enzimas glicosil-hidrolasas en la base de datos Carbohydrate Active Enzyme (CAZY) ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)). Esas familias se clasifican en clanes: aquellas que tienen dominios catalíticos similares y aminoácidos conservados en el sitio activo sugieren que derivan de un ancestro común y son por tanto, clasificadas dentro de un mismo clan. Las GH son un grupo extendido de enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y una molécula diferente. Las familias mayoritarias son GH1, que incluye BGLs de animales, Archaea y plantas y GH3; que comprende algunas enzimas de bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Cairns & Esen,

2010; Krisch, Takó, Papp, & Vágvölgyi, 2010). En la **Figura 1.6** se muestra la estructura cristalográfica de dos BGLs representativas de las familias GH1 y GH3 (Karkehabadi et al., 2014; Tribolo, Berrin, Kroon, Czjzek, & Juge, 2007).



**Figura 1.6.** Estructuras cristalográficas de BGLs de diferentes familias del clan GH.

A: BGL humana citosólica de la familia GH1 (acceso: [Mmdb\\_id: 46920](#)); el plegamiento de la cadena principal de la enzima es una estructura barril  $\beta/\alpha$  y que es común para las glucosil hidrolasas de la Familia 1 (Tribolo et al., 20017).

B: BGL *Trichoderma reesei* (familia GH3) (acceso: [Mmdb\\_id: 105998](#)). Conformada por repeticiones alternas de  $\alpha$ -hélices y barril  $\beta/\alpha$ , presentes en muchas GH3–glucosidasas (Karkehabadi et al., 2014).

Basado en la especificidad de sustrato, estas enzimas se clasifican en: aril-BGLs, que presentan elevada afinidad hacia aril- $\beta$ -D-glucósidos (Kalyani et al., 2012), celobiasas, que hidrolizan únicamente disacáridos (Das, Berke-Schlessel, Ji, McDonough, & Wei, 2011) y BGLs de amplia especificidad las cuales son activas frente a la mayoría de los sustratos descritos para este tipo de enzimas (Li et al., 2018).

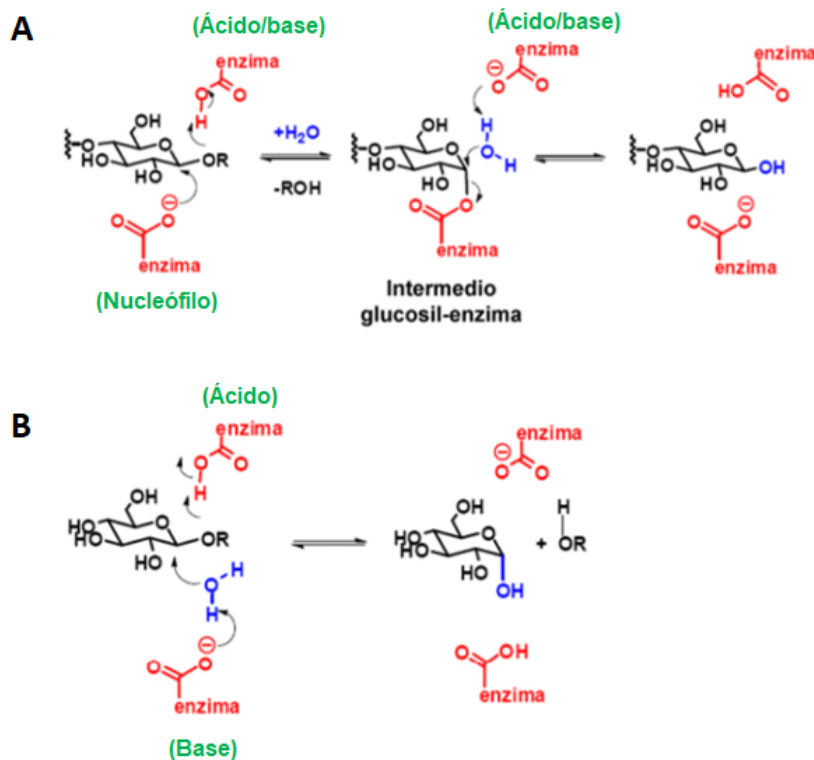
### **Se han descrito dos mecanismos de catálisis de hidrólisis del enlace glucosídico mediado por BGLs: retención e inversión**

La hidrólisis del enlace glicosídico está mediada por dos residuos catalíticos de glutamato (Glu) presentes en el sitio activo de la enzima. Los grupos funcionales involucrados de estos residuos son los carboxílicos, uno de ellos actúa como nucleófilo y el segundo como catalizador ácido/base (Cairns & Esen, 2010). Para mayoría de las BGLs que han sido clasificadas en las familias GH1, GH3 y GH30



se ha observado que su mecanismo de catálisis es el de retención y que éste ocurre en dos pasos: glicosidación y deglicosidación. En el paso inicial de glicosidación, el residuo que actúa como ácido/base dona un protón al sustrato, lo que conduce a la formación del ión oxocarbonio. A continuación, el residuo que actúa como nucleófilo, hace un ataque nucleofílico al carbono C1 anomérico de la molécula de glucosa, lo que resulta en la unión covalente de la molécula de glucosa a la enzima (intermediario glucosil-enzima), liberándose el grupo R del sustrato (la aglicona). Por último, en el paso de deglicosidación una molécula de agua activada por el residuo base, ataca al intermediario glucosil-enzima, desplazando la glucosa (**Figura 1.7A**) (Vasella, Davies, & Böhm, 2002). Este mecanismo se demostró inicialmente para la familia GH1 mientras que para otras BGLs minoritarias de la familia GH9 se ha observado el mecanismo de inversión. Este tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido/base en el cual uno de los dos residuos carboxílicos opera como base, facilitando el ataque nucleofílico de una molécula de agua al carbono anomérico C1 de la glucosa, desplazando así la aglicona (**Figura 1.7B**) (Ahmed, Nasim, Batool, & Bibi, 2017; Gil, 2015)

La principal diferencia estructural entre las GH que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos mediante mecanismo de retención o inversión, es la distancia de separación entre los grupos carboxilos de los residuos de Glu involucrados en la catálisis. En aquellas que operan mediante mecanismo de retención, los residuos involucrados están más próximos (5-6 Å) que en aquellas que lo hacen mediante mecanismo de inversión (9-10 Å). La mayor distancia entre los residuos en las enzimas con mecanismo de inversión facilita la entrada de agua (Mccarter & Withers, 1994).



**Figura 1.7.** Mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico mediado por β-glucosidasas: (A) mecanismo de retención y (B) de inversión. Adaptado de Gil Muñoz (2015), Tesis Doctoral.

### Inhibición de BGLs microbianas por glucosa y etanol

En hongos y bacterias, estas enzimas se encuentran vinculadas al metabolismo de fuentes de carbono como la celulosa. Las celulasas hidrolizan parcialmente su sustrato, dando lugar a oligosacáridos cortos y el disacárido celobiosa, que es subsecuentemente hidrolizado por BGLs, dando glucosa libre disponible para el metabolismo (Juhász, Egyházy, & Réczey, 2005). Las BGLs de diferentes microorganismos están conformadas por una o más subunidades y si bien se han reportado algunas neutras y alcalinas (pH óptimo 7-9) la mayoría son ácidas con valores de pH óptimo en el rango de 5-6. La temperatura óptima de estas enzimas es de 25-90°C con una media del entorno de los 50-55°C (Cairns & Esen, 2010). La localización celular de las BGLs de microorganismos es variable, algunas son intracelulares, otras se localizan en el periplasma, en la membrana y algunas son extracelulares (Bhatia, Mishra, & Bisaria, 2002).

Está ampliamente reportado que la mayoría de las BGLs microbianas se inhiben en presencia de su producto de reacción, glucosa (Barbagallo, Palmeri, Fabiano,

Rapisarda, & Spagna, 2007; Barbagallo, Spagna, Palmeri, Restuccia, & Giudici, 2004) y en relación a su aplicación enológica, esto plantea una desventaja debido a las elevadas concentraciones de glucosa presente en el mosto (en el entorno de los 100 g/L) (L. Chen, Li, & Zong, 2012). Muchas BGLs se inhiben además en presencia de etanol, otra limitante para su aplicación en la elaboración de bebidas alcohólicas (Swangkeaw et al., 2011), lo que plantea el desafío de hallar enzimas que sean activas y estables en el proceso de elaboración de vinos.

## **BGLs EN AMBIENTES ENOLÓGICOS**

### ***Las BGLs de uvas tienen limitada actividad durante el proceso de vinificación***

Como se mencionó anteriormente, las BGLs se encuentran en un gran número de organismos. En cuanto al ambiente enológico, se han reportado en uvas (*Vitis vinífera*), en bacterias del género *Oenococcus*, en algunas pocas levaduras *Saccharomyces*, varias especies de no-*Saccharomyces* y en hongos filamentosos. En uvas, los niveles de expresión de BGL se incrementan rápidamente con la coloración del fruto, lo que sugiere que la enzima está directamente involucrada en el proceso de maduración del mismo (Sun et al., 2014). Estas enzimas presentan baja actividad a pH ácido y son fuertemente inhibidas por glucosa y etanol, por lo que su participación durante la vinificación es limitada (Ugliano, 2009). Además, las BGLs de uvas se localizan principalmente en la cáscara, lo que también contribuye a su limitada actividad durante el procesamiento del mosto (Sarry & Gunata 2004).

### ***BGLs de bacterias lácticas como potenciales liberadoras de aromas***

La mayoría de los estudios de bacterias lácticas en el área de enología se centran en la contribución de estos microorganismos por llevar a cabo la fermentación maloláctica (FML) (Mesas, Rodríguez & Alegre &, 2011; Hernandez-Orte et al., 2009). Sin embargo, desde hace algunos años se viene prestando particular

interés en el estudio de la producción de actividad BGL por *Oenococcus oeni* y en cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Michlmayr & Kneifel, 2014; Olguín, Alegret, Bordons, & Reguant, 2011). *O. oeni* se encuentra actualmente entre las especies de bacterias lácticas mejor estudiadas con respecto a su actividad BGL (Michlmayr et al., 2012). Numerosos estudios sobre el uso directo de bacterias lácticas durante la FML han demostrado su capacidad de liberar terpenos a partir de precursores glicosilados (Mesas, Rodríguez & Alegre &, 2011; Cabaroglu et al., 2003; Hernandez-Orte et al., 2009). Otras BGLs de bacterias lácticas han sido purificadas y caracterizadas (completa o parcialmente) y los estudios han demostrado que en general son activas en presencia de etanol pero inhibidas por concentraciones elevadas de glucosa (Dong et al., 2014; Michlmayr et al., 2010).

### ***Especies de levaduras no-Saccharomyces productoras de actividad BGL***

Históricamente se especulaba que durante el proceso fermentativo del vino, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* era la que presentaba responsabilidad exclusiva en el desarrollo de aromas. Sin embargo, la alta proporción de levaduras no-*Saccharomyces* en uvas despertó el interés en la investigación de las levaduras nativas que forman parte de la vid y sus cualidades para la elaboración de vinos con atributos distintivos (Carrau, Gaggero, & Aguilar, 2015; Garofalo et al., 2018). Si bien *S. cerevisiae* es la principal levadura enológica, los individuos de esta especie no se caracterizan por ser productores de cantidades significativas de enzimas extracelulares hidrolíticas (proteasas, glicosidasas, glucanasas). En cambio, se observó que numerosas levaduras no-*Saccharomyces* son productoras de actividad BGL (Arroyo, Cordero, Serrano, & Valero, 2010; López M.C., Mateo & Maicas, 2015; Cordero Otero et al., 2003; Fia, Giovani, & Rosi, 2005; Maturano, Assof, & Nally, 2015; de Ovalle, Brena, Fariña, & González-Pombo, 2016; Pérez et al., 2011; Plessis et al., 2017). A su vez, se ha observado que la producción de actividad BGL, tiene un efecto significativo en el desarrollo de aromas (de Ovalle, Brena, & González Pombo; 2021; González-Pombo, Fariña, Carrau, Batista-Viera, & Brena, 2011; Mateo, Peris, Ibañez, & Maicas, 2011). En la

**Tabla 1.2** se muestran ejemplos de especies de levaduras no-*Saccharomyces* con actividad BGL, la mayoría aisladas de ambientes enológicos.

**Tabla 1.2** Levaduras no-*Saccharomyces* con actividad  $\beta$ -glucosidasa, mayoritariamente aisladas de ambientes enológicos.

Género	Especie	Origen	Referencia
<i>Brettanomyces</i>	<i>sp</i>	cava	Cordero Otero et al., 2003
<i>Candida</i>	<i>colliculosa</i>	cava	Cordero Otero et al., 2003
	<i>guilliermondii</i>	viñedo	Cordero Otero et al., 2003
	<i>hellenica</i>	viñedo	Cordero Otero et al., 2003
	<i>oleophica</i>	viñedo	Cordero Otero et al., 2003
	<i>pelliculosa</i>	viñedo	Cordero Otero et al., 2003
	<i>railenensis</i>	uva	Pérez et al., 2011
<i>Cryptococcus</i>	<i>sake</i>	mosto	Maturano et al., 2015
	<i>flavescens</i>	uva	Pérez et al., 2011
<i>Debaryomyces</i>	<i>polymorphus</i>	no determinado	Cordero Otero et al., 2003
	<i>pseudopolymorphus</i>	cava	Árevalo-Villena et al., 2007
	<i>maramus</i>	no determinado	Cordero Otero et al., 2003
	<i>vanriijiae</i>	mosto	Maturano et al., 2015
	<i>hansenii</i>	fermentación	Fia et al., 2005
<i>Hanseniaspora</i>	<i>ovarium</i>	mosto	Plessis et al., 2017
	<i>vinae</i>	mosto	Mateo et al., 2011
<i>Hansenula</i>	<i>sp</i>	uva	Arroyo et al., 2010
<i>Issatchenkia</i>	<i>terricola</i>	viñedo	González-Pombo et al., 2011; Shi et al., 2019
	<i>orientalis</i>	viñedo	de Ovalle et al., 2016; Shi et al., 2019
<i>Klockera</i>	<i>sp</i>	cava	Cordero Otero et al., 2003
<i>Kluveromyces</i>	<i>fragilis</i>	ATCC 12424	Pérez et al., 2011
	<i>thernotolerans</i>	uva	Arroyo et al., 2010
<i>Metchnikowa</i>	<i>pulcherrima</i>	mosto	González Pombo et al, 2008 Plessis et al., 2017
	<i>fructicola</i>	uva	Pérez et al., 2011
<i>Pachysolen</i>	<i>tannophilus</i>	ATCC 32691	Pérez et al., 2011
<i>Pichia</i>	<i>anomala</i>	mosto	Mateo et al., 2011
	<i>carsonii</i>	no determinado	Cordero Otero et al., 2003
	<i>farinosa</i>	viñedo	Cordero Otero et al., 2003
	<i>kluyveri</i>	cava	Cordero Otero et al., 2003
	<i>stipitis</i>	NRRL Y7124	Pérez et al., 2011
	<i>membranifaciens</i>	fermentación	Lopez et al., 2015
<i>Rhodotorula</i>	<i>sp</i>	uva	Arroyo et al., 2010
<i>Torulaspota</i>	<i>delbrueckii</i>	mosto	Mateo et al., 2011

### ***Preparaciones enzimáticas comerciales de hongos filamentosos incluyen actividad de BGL***

Se ha reportado actividad BGL en diversos hongos filamentosos, principalmente de géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Pogorzelski & Wilkowska, 2007). Las preparaciones enzimáticas comerciales usualmente provienen de hongos filamentosos ubicuos no patogénos aislados del suelo, que presentan elevada diversidad de actividades enzimáticas muy estables y activas. Las utilizadas en enología mayoritariamente son extractos enzimáticos de *Aspergillus sp.*, y contienen actividades enzimáticas de tipo pectinasas,  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucanasas, celulasas, hemicelulasas, proteasas, glicosidasas, entre otras y se utilizan con objetivos diversos (Canal-Llaubères, 2003). Las enzimas pectolíticas son empleadas para la clarificación principalmente de vinos blancos y en conjunto con celulasas y hemicelulasas, mejoran la extracción de color. Las proteasas son útiles para la degradación de proteínas y permiten evitar su posterior precipitación en botella. En tanto, las glicosidasas como se mencionó previamente, son capaces de liberar aromas a partir de precursores glicosídicos no odorantes. En general, las BGLs de *Aspergillus sp.* han mostrado una buena estabilidad al pH ácido de los jugos de frutas y mayor estabilidad frente a la temperatura que las de plantas y levaduras. Sin embargo, son fuertemente inhibidas por glucosa, por lo que es recomendable su uso una vez finalizada la fermentación alcohólica (Pogorzelski & Wilkowska, 2007). Como desventaja, estas preparaciones presentan múltiples actividades enzimáticas lo que las hace poco específicas, conllevando en ocasiones a reacciones indeseadas. Un claro ejemplo es la actividad cinamil-esterasa, productora de vinilfenoles que dan aromas defectuosos (Canal-Llaubères, 2003).

Las actividades enzimáticas de los microorganismos juegan un papel clave en la calidad del vino pudiendo influir en el aroma, color y sabor, así como en las características físicas como la turbidez y el cuerpo del producto final. El uso de enzimas purificadas permitiría aportar al vino características distinguibles, evitándose reacciones colaterales indeseables. Varios investigadores se han centrado en el estudio y optimización de diferentes enzimas con potencial

aplicación a nivel industrial (König, Uden, & Fröhlich, 2017; Ottone, Romero, Aburto, Illanes, & Wilson, 2020). El potencial de diferentes BGLs para la liberación de aromas en vinos es muy promisorio porque podría permitir desarrollar o incrementar notas de interés a partir de precursores glicosídicos no odorantes (Dong et al., 2014; González-Pombo et al., 2008).

## PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

### **La optimización de la producción es clave para la obtención de enzimas microbianas a nivel industrial**

La producción de enzimas microbianas incluye una serie de etapas iniciales, las cuales se conocen como *upstream* y etapas posteriores o de separación, conocidas como *downstream*. Las primeras consisten en el mantenimiento de la cepa, diseño, preparación y optimización de medios y condiciones de cultivo. Las etapas *downstream* son de recuperación, purificación (si se requiere) y formulación del producto (Castillo Rosales & Rodríguez Alegría, 2014). El primer extracto enzimático para su uso en alimentos fue desarrollado en el año 1922 por la empresa francesa Rapidase (actualmente DSM Food Specialities), destinada a la producción de enzimas para la industria de la bebida (Bajard-Sparrow, Fauveau, Grassin, & Pellerín, 2006).

En general, se parte del microorganismo seleccionado que se cultiva en fermentadores bajo condiciones óptimas de cultivo y de inducción, algo que se logra mediante la disponibilidad de sustratos adecuados. Para la producción de enzimas utilizadas en enología por ejemplo, un medio rico en pectinas inducirá la producción de pectinasas. Para optimizar la producción de las enzimas de interés se estudia la influencia el tipo de cultivo (líquido, semi-sólido, etc.); la composición del medio nutriente (fuente de carbono, de nitrógeno, sustratos, inductores, etc.), así como las condiciones de aireación (aerobio, semi-aerobio, anaerobio), temperatura y pH iniciales. La modificación de las condiciones de cultivo puede conducir a una mejora en la productividad sin necesidad de recurrir a modificaciones genéticas del organismo, sin embargo, no siempre es posible alcanzar el nivel de expresión buscado. En el escalado del bioproceso, el uso de

biorreactores de tipo discontinuo (*batch*), semi-continuo (*batch* alimentado) o continuos, proporcionan un entorno (mecánico y bioquímico) que permite controlar la transferencia de nutrientes y oxígeno a las células. Esto conduce a la obtención de cantidades significativas de biomasa, de una proteína o metabolito de interés (Rodríguez & Toca-herrera, 2007; Thiry, Cingolani, & Thiry, 2002). Dependiendo de los requerimientos de su aplicación, las enzimas obtenidas pueden purificarse parcial o completamente. Esto último tiene como ventaja el valor agregado del grado de pureza, lo que asegurará homogeneidad en los resultados de su aplicación. Como desventaja, se incrementan los costos de producción.

### **La producción de proteínas recombinantes es una estrategia económica para la producción de enzimas de interés**

La producción recombinante permite obtener cantidades significativas de proteínas y enzimas de interés. El clonado y la expresión recombinante de proteínas surgió en el año 1982 con la producción de insulina humana recombinante, marcando una revolución en biología molecular (Pham, 2000). Resumidamente, una vez obtenida la secuencia codificante de la proteína la estrategia más frecuentemente utilizada es el uso de vectores de expresión conteniendo el gen de interés y otras características que permitan la selección (como genes de resistencia a antibióticos) y promotores que permitan la inducción de la expresión del gen correspondiente, en el organismo hospedador elegido. El rápido crecimiento de la biología molecular, la disponibilidad de la información en bases de datos y las herramientas bioinformáticas han permitido un acelerado avance de la investigación de genes y genomas a un bajo costo. Para la elección del método a emplear para la producción recombinante de una proteína deben tenerse en cuenta varios factores tales como el origen biológico de la proteína, sus propiedades químicas y biológicas, el bioproceso de producción y la aplicación (Guerrero-Olazarán, Cab-Barrera, Galán-Wong, & Viader-Salvadó, 2004). El origen biológico de la proteína es un factor importante ya que en general se cumple que un sistema de expresión eucariota es más eficiente para sintetizar una proteína de ese origen en comparación con un



sistema de expresión procariota. En cuanto a las propiedades, es importante evaluar el tamaño (masa molecular), punto isoeléctrico, tipo de modificaciones post-traduccionales presentes, su estabilidad a condiciones de pH, temperatura y susceptibilidad a la proteólisis. Es importante también definir el destino celular deseado (extracelular o intracelular) y el grado de pureza que se quiera obtener. El tipo y condiciones operacionales de cultivo dependen críticamente de la escala requerida y el costo del producto final. Por último, debe considerarse cuál será la aplicación de la proteína: biomédica (agentes terapéuticos, vacunas y diagnóstico clínico), en alimentos (procesos industriales, aditivos y nutracéuticos), u otras industrias (Palomares, Estrada-Mondaca, & Ramírez, 2006).

## **INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS**

### **El uso de enzimas inmovilizadas en la industria es creciente**

La inmovilización de enzimas es un proceso en el cual se confina o localiza el biocatalizador en una región del espacio o en una matriz, preferentemente sólida, para su posterior uso (Brena, González-Pombo, & Batista-Viera, 2013). La utilización de enzimas inmovilizadas presenta numerosas ventajas respecto a las enzimas en solución, entre ellas posibilita su reúso, facilita su separación del producto y en ocasiones, incrementa su estabilidad operacional. En cuanto a las desventajas se destacan el incremento de los costos debido a la inmovilización y la posible ocurrencia de problemas difusionales de transferencia de sustratos y productos (Fajardo-Ochoa, Osuna-Castro, Villa Velázquez-Mendoza, Escalante-Minakata, & Ibarra-Junquera, 2011). El desarrollo de métodos que permitan el reúso de biocatalizadores comenzó a principios del siglo XX y los primeros procesos a nivel industrial utilizando enzimas inmovilizadas fueron escalados recién en los años sesenta. En 1969 la compañía japonesa Tanabe-Seiyaku llevó a cabo por primera vez la producción industrial de L-aminoácidos mediante el uso de un reactor enzimático con L-aminoacilasa inmovilizada. Las compañías Bayer AG (Alemania) y Beecham Pharmaceuticals (Inglaterra) desarrollaron la producción de precursores de penicilinas semi-sintéticas mediante el uso de penicilina G acilasa inmovilizada. A principios de los setenta, el costo de

producción de jarabes de fructosa a partir de almidón de maíz disminuyó drásticamente gracias al uso glucosa isomerasa inmovilizada. En las últimas décadas el desarrollo de procesos industriales con enzimas inmovilizadas se ha incrementado y ha avanzado hacia un diseño más racional del proceso de inmovilización y del reactor, lo que ha permitido en algunos casos, mejorar incluso la eficiencia catalítica (Castillo Rosales & Rodríguez Alegría, 2014).

Existen numerosos métodos de inmovilización, químicas de unión y tipos de soportes, cuya selección dependerá principalmente de las características de la enzima y la aplicación (Brena, González-Pombo, & Batista-Viera, 2013; Giacomini, Villarino, Franco-Fraguas, & Batista-Viera, 1998; López-Gallego, M. Guisan, & Betancor, 2013).

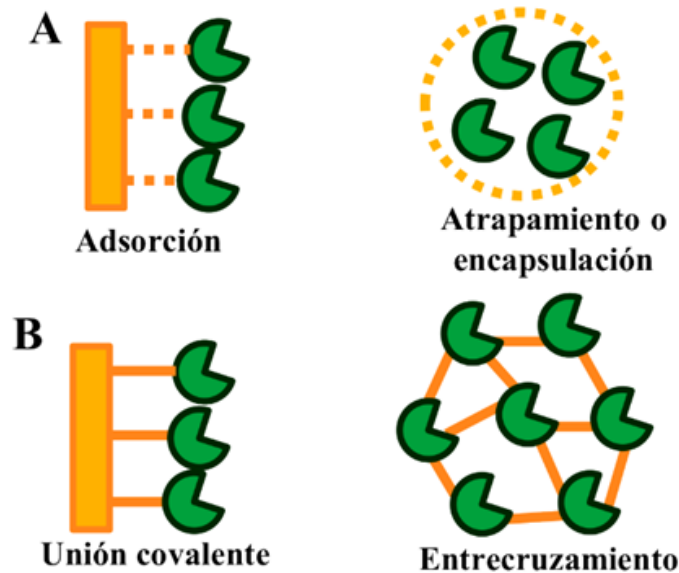
### **Existe una amplia variedad de soportes y metodologías para inmovilización de enzimas**

El soporte ideal debería ser sólido, hidrofílico, inerte, resistente al ataque microbiano, a la compresión y de bajo costo. Adicionalmente, es deseable que sea biodegradable y no tóxico (Kourkoutas, Bekatorou, Banat, Marchant, & Koutinas, 2004).

Los soportes se clasifican según su composición química como orgánicos e inorgánicos y se pueden subdividir en polímeros naturales y sintéticos. Los más utilizados son agarosa, quitosano, alginato, dextranos, poliamidas, poliestirenos, sílice, vidrio, policerámicas (Brena, González-Pombo, & Batista-Viera, 2013; Li et al., 2012; Mohamad, Haziqah, Marzuki, Buang, & Wahab, 2015). En el caso de los soportes porosos, una elevada área superficial implica ventajas entre las que se destacan la alta capacidad de carga del biocatalizador, así como una mayor protección del mismo por el microambiente de la matriz. En términos generales, los tamaños de poro y de partícula del soporte definen el área de superficie total y por lo tanto, afectan de manera crítica la capacidad de unión de las enzimas (Pedroche et al., 2007).

La elección de la metodología de unión de la enzima al soporte dependerá fundamentalmente de las características físico-químicas del soporte (grupos reactivos disponibles, tamaño de poro o partícula, etc.), de su costo y sin dudas,

de las características bioquímicas del biocatalizador a inmovilizar. Los mecanismos de unión más comunes son de adsorción, unión covalente, atrapamiento (o encapsulación) y entrecruzamiento (**Figura 1.8**) (Gotor Fernández & Hernáiz Gómez Dégano, 2017).



**Figura 1.8.** Esquema representativo de métodos de inmovilización de enzimas. Extraído de Gotor Fernández & Hernáiz Gomez-Degano, 2017.

En la inmovilización por adsorción la enzima se une al soporte mediante interacciones iónicas o hidrofóbicas. En este caso, debido a que la unión se da a través de enlaces débiles, se hace necesario evaluar si la enzima se desorbe del soporte a lo largo del tiempo (*leakage*). La inmovilización covalente puede ser mediante un único enlace por molécula de enzima (unipuntual) o a través de varios enlaces (multipuntual). En general, la estabilidad de una enzima inmovilizada por unión covalente multipuntual suele ser mayor que por inmovilización covalente unipuntual y más estable aún que la enzima soluble (Mateo, Palomo, Fernandez-Lorente, Guisan, & Fernandez-Lafuente, 2007). La inmovilización covalente es de los métodos más comúnmente utilizados y dado que se trata de enlaces fuertes, la pérdida de enzima a la solución ya no constituye una dificultad. Como desventaja, se dificulta la regeneración de la matriz una vez terminada la vida útil de la enzima. En la inmovilización por atrapamiento (o encapsulación) la enzima queda retenida físicamente en las cavidades de la matriz

sólida porosa, la cual está constituida por polímeros que pueden formar geles o fibras. Si bien el mecanismo más común de estabilización es el covalente, en algunos casos se han observado mejoras en la estabilidad mediante atrapamiento ya que se genera un microambiente en torno a la enzima que la protege del medio. Sin embargo, esta misma razón conlleva al inconveniente de problemas difusionales en los que el acceso a determinados sustratos se dificulta y esto se traduce en cinéticas más lentas o incluso en pérdida de actividad si se trata de sustratos de alta masa molecular (Illanes, 1999; Pedroche et al., 2007; Varavinit, Chaokasem, & Shobsngob, 2002).

Por último, en la inmovilización por entrecruzamiento se emplean agentes entrecruzantes bifuncionales generándose enlaces covalentes entre las moléculas de enzima. Como ventaja, se ha observado que esto mejora la estabilidad de las enzimas inmovilizadas. Como desventaja, puede ocurrir pérdida significativa de actividad luego del proceso de entrecruzamiento y también ocurren problemas difusionales (Mohamad et al., 2015; Gotor Fernández & Hernáiz Gómez Dégano, 2017).

Considerando las eventuales aplicaciones enológicas de las BGLs, y la baja estabilidad reportada de estas enzimas purificadas, se plantea la inmovilización como estrategia de estabilización y el posible reúso del biocatalizador inmovilizado (Vazquez-Ortega, Alcaraz-Fructuoso, Rojas-Contreras, López-Miranda, & Fernandez-Lafuente, 2018).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### ANTECEDENTES Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

Como se mencionó anteriormente, existe un interés creciente en el conocimiento de la diversidad genética de la microbiota de la vid, las características bioquímicas de los microorganismos y su posible uso en la obtención de vinos cada vez más distintivos. El potencial metabólico de los organismos es el resultado de las características y propiedades de sus enzimas por lo que la búsqueda de biocatalizadores con actividades específicas para su uso en enología es muy promisorio (Belda et al., 2017). En la industria enológica se utilizan muchas veces preparados multi-enzimáticos comerciales con diversos fines, como por ejemplo, potenciar los aromas varietales, pero tienden a producir vinos menos distintivos y muchas veces generan productos secundarios no deseados. A su vez, el uso de cepas *S. cerevisiae* comerciales ampliamente utilizadas en las bodegas para la fermentación, conlleva a la uniformización de las características de los vinos obtenidos. Como alternativa, se ha profundizado en el estudio y uso de levaduras aisladas de ecosistemas vínicos y por tanto adaptadas al medio enológico para aportar complejidad aromática. Son numerosos los trabajos que utilizan levaduras no *Saccharomyces* seleccionadas, como co-inóculo, en conjunto con *S. cerevisiae* (Kim, Hong, & Park, 2008; Morales, Rojas, Quirós, & Gonzalez, 2015; Arévalo-Villena, 2006). Esta estrategia es útil para aplicaciones tales como disminución del grado alcohólico, producción de glicerol, entre otras. Sin embargo, el perfil de aromas producidos durante el proceso está directamente vinculado al metabolismo del microorganismo en esa condición y no siempre es el deseado. A modo de ejemplo, de acuerdo a resultados previos de nuestro grupo, la cepa *I. terricola* 0621 (aislada de uva Tannat) demostró producir una BGL activa frente a precursores aromáticos de vino Moscatel blanco (González-Pombo et al., 2011). Sin embargo, su uso en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae* no mostró un incremento significativo de aromas primarios en mosto de variedad Viura (resultados pasantía en ICVV, Logroño- España, aún no publicados). Se observó un incremento de aromas fermentativos no deseados

como acetato de etilo, lo que coincide con reportes de otras cepas de *I. terricola* que han sido descartadas para su uso en fermentaciones por la producción de este compuesto (Li et al., 2010). En contraposición, la BGL *I. terricola* purificada e inmovilizada produjo resultados promisorios y fue capaz de incrementar selectivamente terpenos y norisoprenoides en vino moscatel joven (González-Pombo et al., 2011). Estos resultados apuntan a que el uso de las enzimas BGLs purificadas puede representar una alternativa con alto potencial frente al uso de las cepas en fermentaciones donde su rol en el proceso es de difícil control.

Las enzimas purificadas pueden catalizar la liberación de volátiles aromáticos de los precursores glicosilados presentes en el vino de forma más selectiva, sin producir modificaciones químicas en las agliconas. De esta manera es esperable que se logre un incremento de aromas que potencie la variedad (o que aporten notas distintivas al aroma final del producto), algo cada vez más valorado por los consumidores. La selección y aplicación de enzimas purificadas en vinos jóvenes, es una estrategia alternativa y menos explorada, que tiene el potencial de permitir un mayor control de las características sensoriales del producto final.

Enfocado en ese objetivo, desde hace ya varios años nuestro grupo de trabajo se ha centrado en la búsqueda de nuevos biocatalizadores de BGL con potencial aplicación en el desarrollo de aromas varietales en vinos jóvenes. A partir de un *screening* de producción de actividad BGL de una colección de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de uvas y mostos provenientes de viñedos uruguayos, se seleccionaron y estudiaron cepas de *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* e *Issatchenkia terricola*. Sus BGLs fueron purificadas, caracterizadas y estudiadas en condiciones enológicas para su aplicación (González-Pombo et al., 2011, 2008; González-Pombo, 2010). Los resultados promisorios despertaron el interés en continuar explorando la búsqueda y el estudio de nuevos biocatalizadores de BGLs y estrategias alternativas para su aplicación enológica.

## OBJETIVOS

### Generales

Profundizar en el conocimiento de BGLs de cepas no-*Saccharomyces* nativas y desarrollar herramientas que posibiliten su utilización enológica para generar vinos de calidad con características distintivas.

### Específicos

- Seleccionar enzimas con actividad BGL a partir de cepas nativas no-*Saccharomyces*.
- Producir, purificar, realizar la caracterización bioquímica e inmovilizar una nueva BGL de una cepa nativa.
- Estudiar la actividad y especificidad de las BGLs de cepas nativas sobre precursores sintéticos y naturales (disacáridos y precursores glicosídicos de vinos).
- Evaluar el impacto de estas enzimas en la liberación de aroma en vinos y su comparación con un preparado comercial utilizado en la industria enológica.
- Optimizar el cultivo y escalar la producción de BGL.
- Generar una cepa de *S. cerevisiae* recombinante, que exprese una BGL de una cepa nativa.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA SELECCIÓN DE LAS CEPAS

##### Mantenimiento de las cepas

Las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* M522, utilizadas en la presente Tesis, pertenecen al cepario del Laboratorio de Enología de la Cátedra de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL) de la Facultad de Química, UdelaR. La cepa de *S. cerevisiae* T73-4 fue cortesía de Dr. Ramón González del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV), (Logroño, España). El mantenimiento de las cepas de levadura se realizó en freezer a -80°C en medio YPD (10 g/L extracto de levadura 20 g/L glucosa, 20 g/L peptona) conteniendo 20% v/v de glicerol como crioprotector.

Las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y XL-1 pertenecen a la Sección Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias, UdelaR. El mantenimiento de las mismas se realizó en freezer a -80°C en medio LB (10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L de extracto de levadura) conteniendo 20% v/v de glicerol.

##### Selección en placa

La selección de cepas productoras de actividad BGL se realizó según Pérez et al., en medio EGA (esculina 1 g/L, Cloruro Férrico 0.3 g/L, peptona 1 g/L, extracto de levadura 25 g/L, glicerol 8 ml/L, agar 20 g/L) modificando el pH a 4.0 con tampón citrato-fosfato 50 mM pH 4.0 (Pérez et al., 2011). Como control negativo de actividad se empleó la cepa M522 de *Saccharomyces cerevisiae* y como control positivo, ATCC 12424 de *Kluveromyces fragilis*.

##### Curvas de crecimiento y producción de BGL

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio YPG modificado (25 g/L extracto de levadura, 1 g/L de peptona y 8 mL/L de glicerol) y en YPG



modificado, suplementado con celobiosa (20 g/L). Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer al 10% de volumen, a 28°C y con agitación de 180 rpm. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y el crecimiento se determinó monitoreando la absorbancia a 600 nm (Abs 600 nm). Para la determinación de la actividad de la enzima extracelular, el cultivo se centrifugó a 5000 xg y 4°C, durante 5 minutos y se determinó la actividad BGL en el sobrenadante. El pellet (biomasa) se lavó dos veces con una solución de EDTA 1 mM y se centrifugó en las condiciones ya descritas. A continuación, las muestras se resuspendieron en un volumen mínimo de tampón de actividad (acetato de sodio 0.1 M pH 4.5) y se sonicaron (Fisher Scientific VCX750), en baño de hielo, por 4 ciclos de 20 segundos a 40% de amplitud y se centrifugaron a 5000 xg y 4°C durante 1 min para obtener la fracción soluble intracelular. Ésta última se utilizó para la determinación de la actividad intracelular.

## **PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE BGLs**

### **Cuantificación de la actividad BGL**

La actividad BGL se cuantificó mediante sustrato cromogénico p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido (pNPG) (Sigma-Aldrich). La muestra se incubó con 1.25 mL del sustrato 10 mM (BGL *I. orientalis*) o 25 mM (BGL *I. terricola*), preparado en tampón acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5 (tampón de actividad). A diferentes intervalos de tiempos, la reacción se detuvo mediante la adición de tampón carbonato-bicarbonato 0.2 M, pH 10. A continuación, se determinó la absorbancia a 405 nm (Abs 405 nm). El ensayo de actividad fue desarrollado a temperatura ambiente (23°C). La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol (pNP) en un minuto, a pH 4.5 y temperatura ambiente (23°C).

En los casos en los que se indica específicamente, la actividad BGL se realizó de manera cualitativa mediante el uso del sustrato fluorogénico 4-metilumberifenil- $\beta$ -D-glucósido (4-MUG) (Sigma-Aldrich). La muestra con 5 mM de 4-MUG

preparado en tampón fosfato de sodio 0.1M pH 7.0, fue incubada durante 10 minutos a 37°C. El mismo ensayo se realizó para la determinación de actividad en los geles de electroforesis (zimograma). De la misma manera, el gel fue sumergido con el sustrato e incubado 10 minutos a 37°C. El producto fluorescente se detectó mediante exposición a transiluminador UV (Labnet) (366 nm).

### **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en cuba vertical (BioRad). Los geles empleados fueron discontinuos, con porcentajes de entrecruzamiento del 6% para el gel concentrador y 12% para el gel separador. Los geles, las soluciones tampón y la preparación de las muestras se realizaron siguiendo el protocolo de Biorad (Laboratories Bio-Rad, 2012).

Los geles de electroforesis fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal (Dyballa & Metzger, 2009). El gel se trató con una solución de fijación de composición 10% v/v de ácido acético y 40% v/v de etanol durante 1/2 hora, realizando luego dos lavados con agua destilada. El gel se sumergió en solución de tinción (8% m/v sulfato de amonio, 0.8% v/v ácido fosfórico 0.08% m/v Coomassie coloidal G-250 y 20% v/v metanol) y se incubó toda la noche con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada hasta la visualización de las bandas correspondientes a proteínas.

### **Electroforesis de proteínas en Phast System**

Siguiendo los programas de corridas del fabricante (Pharmacia-Biotech), se realizaron electroforesis de isoelectroenfoque (IEF-PAGE), nativa (NATIVE-PAGE) y desnaturizante (SDS-PAGE), en forma automatizada en equipo Phast System. Los geles utilizados fueron comerciales gradiente de pH de rango 3-9 para IEF-PAGE, gradiente de entrecruzamiento de 8-25% de NATIVE-PAGE y geles homogéneos 12% de SDS-PAGE. Los geles de electroforesis automatizada se tiñeron con nitrato de plata, siguiendo el protocolo del fabricante.

## Cuantificación de proteínas

La estimación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). A 20  $\mu$ L de la muestra se le adicionaron 0.7 mL de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich), la mezcla se homogeneizó y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se construyó una curva de calibración de 0.1 a 2.0 mg/mL con estándar de seroalbúmina bovina, para cada ensayo. La determinación de absorbancia se realizó a 595 nm.

## Obtención del extracto enzimático

El sobrenadante del cultivo se precipitó por *salting out* mediante el agregado de sulfato de amonio (70% de saturación) en baño de hielo, con agitación. A continuación, la suspensión se incubó toda la noche en heladera (4°C) y se centrifugó durante 30 min, a 5000 xg y 4°C. El precipitado se disolvió en mínimo volumen de tampón de actividad y se dializó mediante membranas de celulosa (Sigma-Aldrich) de *cut off* 14.000 Da (extracto enzimático dializado).

## Purificación por intercambio aniónico

Se realizó en columna Mono QTM 5/50 GL (Amersham Biosciences) previamente equilibrada con tampón A: acetato de sodio 20 mM pH 6.0, a temperatura ambiente (23°C) en sistema de cromatografía ÄKTA explorer purifier (Amersham Biosciences), software Unicorn 5.31. Al extracto enzimático se le realizó un recambio por tampón A en columna comercial PD10 (Merck). Un volumen de 0.5 mL del extracto se aplicaron con un flujo de 0.5 mL/min y se lavó con diez volúmenes de columna de tampón A. Las proteínas se eluyeron mediante gradiente salino, incrementando la concentración hasta 1 M de NaCl, con tampón de elución (tampón B), preparado con tampón A suplementado con 1M de la sal. La elución se realizó a una velocidad lineal de 0.5 mL/min y se recogieron fracciones de 0.5 mL. La concentración de proteínas se siguió por

Absorbancia a 280nm (en forma automatizada) y el ensayo de actividad BGL se realizó en todas las fracciones.

El rendimiento de actividad se calculó como el cociente entre la actividad recuperada luego de las fracciones purificadas eluidas (UE totales fracción conteniendo actividad BGL) y la actividad enzimática inicial del extracto (UE totales iniciales) x100.

La actividad específica se determinó mediante el cociente de la actividad enzimática (en UE/mL) y la concentración de proteínas (en mg/mL).

El factor de purificación de la enzima se determinó mediante el cociente de la actividad específica final (luego de la purificación) y la actividad específica inicial.

### **Determinación de la masa molecular**

La masa molecular se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular en equipo AKTA purifier, columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). El ensayo se realizó en tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0 suplementado con 0.15 M de NaCl. Se aplicaron 0.2 mL de la enzima purificada a la columna y la corrida se realizó con un flujo de 0.25 mL/min. Se emplearon los siguientes estándares de peso molecular: blue dextrano (> 2000 kDa), tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), sero albúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43kDa) y ribonucleasa (13.7 kDa) (Sigma-Aldrich).

### **Actividad en presencia de metales**

Con la enzima purificada en solución se estudió el efecto de la presencia de iones metálicos, utilizando el sustrato pNPG suplementado con 10 mM de las siguientes sales: MgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, KCl, NaCl, ZnCl<sub>2</sub>. Adicionalmente, la actividad se evaluó en presencia de 10 mM de sal de EDTA.

### **Determinación de condiciones óptimas de pH y temperatura**

Para la determinación del rango de pH óptimo de actividad de la enzima (soluble e inmovilizada), se realizó el ensayo de actividad con pNPG a los siguientes valores de pH: 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0. El sustrato pNPG en el rango de pH 3.0-5.0 fue preparado en tampón acetato de sodio 0.1 M y a pH 6.0-8.0, con tampón fosfato de sodio 0.1 M.

El rango de temperatura óptima de actividad de la enzima (soluble e inmovilizada) se determinó realizando el ensayo de actividad con sustrato pNPG a diferentes temperaturas. Para ello, el sustrato se termostatózó previamente y la mezcla reactiva se incubó a cada temperatura (22, 37, 50, 60, 70 y 80°C).

### **Determinación de parámetros cinéticos**

Los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  y  $V_{máx}$  de la enzima soluble e inmovilizada se determinaron a temperatura ambiente, mediante ensayo de actividad en un rango de concentraciones 2.0-10 mM de pNPG. El procesamiento de datos se realizó mediante cinética Michaeliana, empleando la linealización de Lineweaver Burk (Lineweaver & Burk, 1934).

### **Actividad y estabilidad en condiciones enológicas**

Se determinó la actividad de la enzima en pNPG suplementado con 100 g/L de glucosa o de etanol (10, 20, 30, 40, 60 y 100 % v/v) y en vino sintético (etanol-agua 12:88 v/v conteniendo 3.5 g/L de ácido tartárico, 2.5 g/L de ácido málico y 60 mg/L de metabisulfito de sodio) a pH 4.0.

### **Especificidad frente a sustratos sintéticos y naturales**

Para evaluar la especificidad de la enzimas, se determinó actividad de BGL *I. orientalis* frente a sustratos sintéticos de tipo aril -( $\alpha$  y  $\beta$ ) -D-glucósidos y sustratos naturales (disacáridos, CMC-celulosa). Para los primeros: p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, o-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido, p-nitrofenil- $\alpha$ -D-

glucopiranosido, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopiranosido, p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido, p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinopiranosido, (Sigma-Aldrich). La actividad se determinó tal como se describió previamente para el sustrato pNPG.

En caso de los disacáridos naturales celobiosa y esculina, sacarosa, y maltosa (Sigma-Aldrich) el ensayo se realizó con 10 mM de cada sustrato, a excepción del polisacárido CMC celulosa (Sigma-Aldrich) para el cual la concentración fue de 5 g/L. La actividad de la enzima se determinó mediante la cuantificación de  $\mu$ moles de glucosa liberados por minuto de reacción, mediante kit enzimático Spinreact (Ctra.Santa Coloma, España).

Los blancos del ensayo fueron realizados en condiciones idénticas al ensayo de actividad, sustituyendo la enzima por tampón de actividad.

En todos los casos, el 100% de actividad se consideró como la actividad de la enzima en pNPG.

### **Inmovilización de BGL**

En todos los casos las inmovilizaciones se realizaron con extracto crudo, precipitado en sulfato de amonio o dializado según la metodología empleada.

#### ***Inmovilización covalente en soporte epoxi-activado***

Se incubaron 2 mL del extracto enzimático (precipitado en sulfato de amonio) conteniendo 0.12 UE (1.5 mg de proteína) disuelto en 3 mL de tampón fosfato de sodio 1 M pH 7.0 por gramo de soporte Eupergit C (Sigma-Aldrich) escurrido. La suspensión se incubó durante 24 h a 4°C con agitación suave. Posteriormente, los grupos epoxi remanentes se bloquearon con 10 mL de solución 3M de glicina, pH 8.0 (ajustado con 2M de NaOH) por g de derivado escurrido. El tratamiento se realizó durante toda la noche en heladera (4°C). El derivado bloqueado se lavó con abundante agua destilada y tampón de actividad y almacenado a 4°C.

### ***Inmovilización iónica en MANAE-agarosa***

La matriz (Sephacrose CL-4B Sigma-Aldrich) se preparó de acuerdo a lo reportado previamente por Fernández-Lafuente et al 1993, mediante reacción con glicidol y posteriormente oxidación con periodato de sodio (gel glioxil-agarosa) (Fernandez-Lafuente et al., 1993).

La inmovilización se realizó incubando 2.0 mL del extracto dializado conteniendo 0.12 UE totales (1.7 mg proteína) con 2.0 mL de tampón de adsorción (acetato de sodio 10 mM pH 5.5) por g de matriz. La suspensión se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Luego el derivado fue lavado con tampón de actividad y almacenado a 4°C.

### ***Síntesis de Nanopartículas (NPs) de sílica***

Las NPs de sílica se sintetizaron con 1 mL de tampón fosfato de sodio 0.1M, pH 8.0, 0.25 mL de polietilenimina 10% v/v, pH 8.0 (Sigma-Aldrich) y 0.25 mL de tetrametil ortosilicato (TMOS) (Sigma-Aldrich) previamente hidrolizado (0.157 mL de TMOS y 1mL de HCl 1 mM) (Jackson et al., 2015). La matriz se centrifugó durante 1 minuto a 1300 xg y se descartó el sobrenadante.

### ***Inmovilización covalente en NPs de sílica***

La activación de las NPs de sílica se realizó con 2.0 mL de una solución de glutaraldehído 5% v/v en tampón fosfato de sodio 200 mM pH 7.0 por g de matriz. El extracto enzimático se dializó en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0 (tampón de inmovilización). Se incubó un volumen de 2.0 mL de extracto dializado conteniendo 0.12 UE (1.6 mg proteína) por g de NPs activadas y durante 5 h, con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó 1 minuto a 1300 xg. El derivado obtenido se lavó con tampón de actividad y almacenó a 4°C.

### ***Inmovilización por atrapamiento en NPs de sílica***

Se realizó un recambio del extracto enzimático dializado en tampón de actividad, por tampón de inmovilización (fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0) en columna de gel filtración PD10 (Merck). A continuación 4.0 mL de la muestra conteniendo 0.24 UE (3.7 mg de proteína) se adicionaron a 1 g de NPs de sílica matriz y se centrifugó durante 1 min a 1300 xg.

### ***Inmovilización iónica en NPs de sílica***

Se incubó 2.0 mL del extracto dializado en tampón de actividad conteniendo 0.12 UE (1.9 mg proteína) por g de NPs de sílica, durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Para el entrecruzamiento, se incubó con una solución de glutaraldehído 0.5% v/v en tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0. La suspensión se incubó 1 h con agitación a temperatura ambiente. Luego de lavados exhaustivos con tampón fosfato de sodio pH 7.0 se dejó 16 h en heladera. Posteriormente, se lavó con tampón de actividad y almacenado a 4°C.

### **Desorción de la enzima (leakage) de las NPs de sílica**

Se realizaron para la enzima BGL *I. orientalis* inmovilizada en NPs de sílica y entrecruzadas con glutaraldehído. El ensayo se realizó incubando la enzima inmovilizada en 10 mL de tampón de actividad durante 20 días, con agitación a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se determinó actividad y proteínas en sobrenadante.

Se evaluó la performance de las inmovilizaciones determinando actividad BGL y proteínas. Para la determinación de actividad ligada a la matriz se utilizaron 100  $\mu$ L de una suspensión estándar preparada con 0.1 g de biocatalizador inmovilizado y 0.9 mL de tampón de actividad.



## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES DE TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

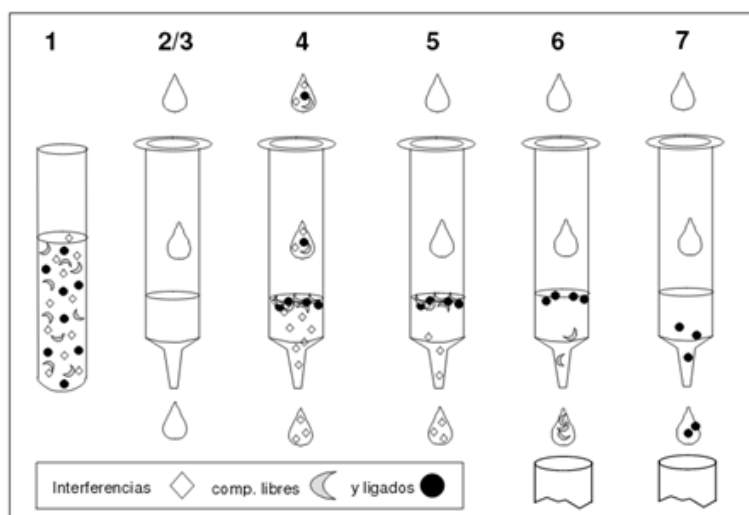
### Tratamientos enzimáticos de vinos

Para los tratamientos sobre glicósidos aislados de vino Moscatel, resuspendidos en vino sintético pH 4.0 y en vinos Moscatel, Tannat y Cabernet sauvignon, se usaron las BGLs inmovilizadas. La BGL *I. orientalis* se inmovilizó en NPs de sílica entrecruzadas con glutaraldehído. La BGL *I. terricola* y las glicosidasas de *A. niger* fueron inmovilizadas según (González-Pombo et al., 2011; González-Pombo et al., 2014). Se incubó 1 UE inmovilizada con 1L de vino, a temperatura ambiente (23°C) y con agitación durante 20 días.

### Extracción de glicósidos y volátiles

La extracción de la fracción ligada (glicósidos) y la fracción libre (volátiles) se realizó por extracción en fase sólida (SPE) en equipo Manifold, mediante el uso de cartuchos comerciales Isolute ENV+ (Biotage) (Boido et al., 2003).

El acondicionamiento de la columna y la elución diferencial de las fracciones se detallan en la **Figura 3.1**. Se realizó una dilución de la muestra de vino (50 mL de vino + 50 mL de agua destilada). Se lavó la columna con 15 mL de metanol y con 20 mL de agua destilada (pasos 2 y 3). A continuación (paso 4) la muestra se aplicó a la columna con un flujo no mayor a 4-5 mL/min y se realizó un lavado con 20 mL de agua destilada para arrastrar las interferencias (paso 5). Los compuestos volátiles (fracción libre) se eluyeron con 30 mL de diclorometano y los glicosilados (fracción ligada) con 30 mL de metanol (pasos 6 y 7).



**Figura 3.1.** Elución diferencial de fracción ligada y libre mediante el uso de cartuchos isolute env+.

En el caso de la fracción ligada, el metanol se eliminó mediante evaporación rotativa y se resuspendió en vino sintético.

En el caso de la fracción libre las muestras se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron a unos pocos mL (3-6 mL) en columna Vigreux y posteriormente, a unos 100  $\mu\text{L}$  con  $\text{N}_2$  líquido previo al análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

### **Análisis y cuantificación de compuestos volátiles**

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS) (Fariña et al., 2015). Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado con un detector de masa Shimadzu QP 5050 y equipado con una columna capilar de sílica fundida (25 m x 0.25 mm d.i.), con fase estacionaria BP 20 (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor) (SGE, Australia). Las condiciones de trabajo fueron: programa de temperatura 40°C (8 min), rampa de 40-180°C de a 3°C/min, 180-220°C a 10°C/min, 220°C (20 min); temperatura del inyector, 250°C; modo de inyección split, relación de split 1:40, volumen inyectado, 1.0  $\mu\text{L}$ . Como gas *carrier* se empleó He, 92.6 kPa (55.9 cm/seg); temperatura de la interfase fue de 250°C y el rango de masas, 40-400 uma.

La identificación se realizó utilizando bases de datos con espectros de referencia (Adams, 2001; McLafferty, & Stauffer 1989) y base de datos del Laboratorio de Biotecnología de Aromas del CYTAL de la Facultad de Química, realizada con estándares y datos reportados en la literatura. La identificación de los compuestos se confirmó por medio de la determinación de índices de retención lineal (Kovats), obtenidos utilizando una mezcla de n-alcanos de referencia (C9-C26).

### **Determinación del índice Glicosil-Glucosa (G-G)**

La fracción de los glicósidos totales hidrolizada durante los tratamientos enzimáticos de vinos, se estimó mediante el índice Glicosil-Glucosa (G-G) (Iland, Cynkar, Francis, Williams, & Coombe, 1995). La fracción ligada se obtuvo mediante SPE en columnas C18 comerciales (Strata C18-E, Phenomenex) para las muestras de vino testigo (sin tratamiento), vino tratado y blanco del ensayo (vino con matriz de inmovilización). El acondicionamiento de la columna se realizó con 10 mL de metanol y 10 mL de agua destilada. A continuación, se aplicaron 10 mL de muestra con flujo 1-2 mL/min. Las interferencias se eliminaron con dos lavados de 30 y 10 mL de agua destilada, respectivamente. La fracción glicosilada se eluyó en dos etapas, la primera mediante el agregado de 1.5 mL de etanol absoluto y la segunda, con 3.0 mL de agua destilada. La fracción fue recogida en matraz aforado de 5.0 mL y se enrasó a dicho volumen con agua destilada. Posteriormente, la hidrólisis se realizó incubando 1 mL de la fracción con 2 mL de ácido sulfúrico 2.25 M, durante 1 h a 100°C. Como control de glucosa inicial de la fracción, se realizó el mismo procedimiento pero con el agregado de agua destilada y realizando el tratamiento a temperatura ambiente. Los glicósidos no hidrolizados se removieron sembrando 2 mL de la muestra hidrolizada a la columna y recolectando la fracción hidrolizada libre de glicósidos. A continuación, las muestras hidrolizadas se neutralizaron de la siguiente manera: a 20  $\mu$ L de muestra se le añadieron 720  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 1.0 M pH 7.6, 180  $\mu$ L de NaOH 2 M y 350  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.25 M. Se determinó la concentración de glucosa mediante kit enzimático Spinreact (Ctra.Santa Coloma, España).

## Determinación del Valor de Actividad Odorante (VAO)

Para aquellos compuestos cuyas concentraciones presentaron diferencias significativas debido a los tratamientos enzimáticos, el VAO se calculó como el cociente entre la concentración (en  $\mu\text{g/L}$ ) del compuesto en la muestra (control o tratamiento) y su valor umbral de percepción (en  $\mu\text{g/L}$ ).

### Evaluación por panel de expertos

La evaluación sensorial se realizó mediante Sección de Evaluación Sensorial del CYTAL de la Facultad de Química. El estudio se realizó mediante Test triangular extendido. Para ello, a los evaluadores se les presentaron tres copas (tapadas con placas Petri de vidrio) rotuladas con números aleatorios. Dos de esas copas contenían vino control y una de ellas, vino tratado. Se les entregó una boleta (Figura 3.2) mediante la cual se les pedía identificaran la muestra diferente y la describieran.

**Figura 3.2** Boleta suministrada a los evaluadores para la realización del test triangular

<b><u>TEST TRIANGULAR</u></b>		
NOMBRE _____		Fecha _____
<b>Instrucciones:</b>		
*Usted recibe 3 muestras de vino. 2 de esas muestras son idénticas y la otra es diferente.		
*Huela las 3 muestras comenzando por la de su izquierda, tápela inmediatamente y use la Tabla para anotar el número de la muestra diferente y describirla brevemente.		
*Repita la operación para los dos siguientes set de muestras.		
SET	CÓDIGO DE LA MUESTRA DIFERENTE	DESCRIPCIÓN
1		
2		
3		
<b>GRACIAS POR SU COLABORACIÓN</b>		

### **Actividad de las enzimas inmovilizadas frente a glucósidos de antocianinas de vinos tintos**

La concentración de gliósidos de antocianinas se analizó en muestras de vino correspondientes a: control (sin tratamiento), blanco de ensayo (incubado con matriz de inmovilización) y post-tratamiento enzimático, según Ribéreau-Gayon & Stonestreet, 1965. Para ello, se mezclaron 1 mL de cada muestra con 1 mL de etanol (conteniendo 1 mL/L de HCl) y se añadieron a 20 mL de una solución 20 mL/L v/v de HCl. Se tomó una alícuota de 10 mL de esa mezcla y se añadieron 4.0 mL de una solución 15 g/L de bisulfito de potasio. En el blanco del ensayo, este último fue reemplazado por agua destilada. Luego de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó absorbancia de las muestras a 520 nm.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA OPTIMIZAR PRODUCCIÓN DE BGL

### Cultivos Erlenmeyer en diferentes medios nutrientes

Se realizaron cultivos de la cepa 0621 de *I. terricola* utilizando medios de cultivo, con diferentes fuentes de carbono y como medio de referencia se utilizó YPG. En la **Tabla 3.1** se muestra la composición de los medios utilizados.

**Tabla 3.1** Composición de medios de cultivo. Todos los medios fueron ajustados a pH 5.0 con tampón citrato-fosfato 50 mM

Tipo	Nombre del medio	Fuente de carbono (concentración)	Composición nutriente (por Litro)
Sintéticos	medio con glicerol	glicerol (10 g/L)	4 g de urea, 1 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,45 g de citrato de sodio, 0,1 g de CaCl <sub>2</sub> ; 0,6 g de MgSO <sub>4</sub> y 1 mL de solución de vitaminas, 1 mL de solución de cationes (solución C) y 1 mL de solución de aniones (solución A). La solución de vitaminas contenía (por litro): 6 mg de ácido fólico, 6 mg de mioinositol, 6 mg de d-biotina, 0,8 g de pantotenato de calcio, 0,8 g de ácido p-aminobenzoico, 0,8 g de riboflavina y 1,6 g de piridoxina. La solución C contenía (por litro): 0,6 g de ácido cítrico, 0,15 g CoCl <sub>2</sub> , 3 g MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O, 5 g ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 15 g FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O y 0,75 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, pH 1,5. La solución A contenía (por litro): 0,65 g de Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0,1 g de KI y 0,1 g de H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , pH 1,5.
	medio con glucosa	glucosa (10 g/L)	
	medio con hesperidina	hesperidina (10 g/L)	
	medio con narangina	narangina (10 g/L)	
Semisintéticos	medio con jugo vegetal	jugo vegetal V8 (10 mL/L)	3 g de extracto de levadura, 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,5 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0,2 g MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.
	medio con melaza de caña	melaza de caña (10 g/L)	
	medio con afrecho de trigo	afrecho de trigo (3 g/L)	

### Condiciones de cultivos en Erlenmeyer

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer (hasta 10% de su volumen) con Abs 600 nm inicial de 0.2, agitación a 180 rpm y temperatura de 28°C. Se tomaron alícuotas a tiempos regulares para determinar crecimiento celular (Abs 600 nm) y actividad BGL del sobrenadante.

Una vez seleccionado el medio de cultivo, se evaluó el efecto de las condiciones experimentales (pH y temperatura) para optimizar la producción de actividad BGL. Se ensayaron valores de pH inicial (4.0, 5.0 y 6.0) y temperaturas de cultivo (23°C y 28°C).

## Condiciones de cultivo en biorreactores

Se llevaron a cabo Biorreactor (Inceltech, Toulouse, Francia) LH-210 de 5 L, en el medio sintético seleccionado y el de referencia (YPG), con aireación de 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm) y agitación de 650 rpm. El pH del cultivo se midió con un electrodo de vidrio Mettler Toledo (Columbus, OH, USA.). El gas de salida se analizó con un detector de O<sub>2</sub> paramagnético (Serie 1100, Servomex, Crowborough, Reino Unido) y un detector infrarrojo de CO<sub>2</sub> (Pir 2000, Horiba, Japón). La absorción de O<sub>2</sub> y las tasas de producción de CO<sub>2</sub> se calcularon de acuerdo con Cooney et al. (Cooney, Wang, & Wang, 2006). Las condiciones del *batch* alimentado para el medio sintético seleccionado, se diseñaron de acuerdo con las ecuaciones derivado de los balances de masa para el sustrato y la biomasa en cultivos limitados en carbono mediante los parámetros cinéticos y estequiométricos calculados en el cultivo en *batch*.

Ecuación 1:

$$SR = \frac{X_f \cdot V_f - X_o \cdot V_o}{Y_{x/s} \cdot (V_f - V_o)}$$

Ecuación 2:

$$F = \frac{\mu_o \cdot X_o V_o}{Y_{x/s} \cdot SR}$$

Donde SR es la concentración de sustrato limitante en el medio de alimentación; X<sub>o</sub>, X<sub>f</sub> la concentración de biomasa al comienzo y al final de la fase de alimentación (g/L), respectivamente; V<sub>o</sub> y V<sub>f</sub>, el volumen inicial y final (L); F, la tasa de alimentación (L/h),  $\mu$ , la tasa de crecimiento específica (h<sup>-1</sup>) e Y<sub>x/s</sub>, coeficiente de rendimiento celular basado en el consumo de fuente de carbono (g célula/g fuente de carbono).

## **PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LA EXPRESIÓN DE BGL**

### **Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

El material genético se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa preparados con una solución 1% de agarosa en tampón Tris-EDTA 1x (10 mM Tris-HCL pH 8 y 1 mM de EDTA disódico). Los geles expuestos al agente intercalante SYBR Safe (Sigma-Aldrich), (2  $\mu$ L del reactivo en 50 mL de Agarosa 1%) fueron revelados por exposición a lámpara UV (260 nm) en cabina de revelado con cámara fotográfica y Software Carestream.

### **Purificación de material genético**

Las purificaciones se realizaron a partir de electroforesis en gel de agarosa y se empleó el kit Monarach PCR and DNA clean up kit (NEB), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Cuantificación del material genético**

Las concentraciones de ADN fueron estimadas por absorbancia A260/A280 en NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific) y de manera más exacta, mediante fluorescencia en Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (ThermoFischer Scientific).

### **Secuenciación de productos**

Los productos de PCR obtenidos en las distintas etapas fueron enviados a secuenciar al servicio secuenciación de MACROGEN (Corea del Sur) y las secuencias fueron analizadas mediante uso de software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA).

### **Propagación de productos en *E. coli* DH5 $\alpha$ o XL-1**

A 50  $\mu$ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (preparadas según Hanahan et al., 1991); se añadió un volumen  $\leq$ 5  $\mu$ L del mix de ligación y se



incubó en baño de hielo durante 25 minutos. A continuación, se realizó un shock térmico de 30 segundos en baño de agua a 42°C. Las células, se transfirieron nuevamente al baño de hielo y se adicionaron 3 volúmenes de medio de cultivo LB (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 10 g/L de peptona). Posteriormente, las células se incubaron en shaker (Labotec) a 37°C y 150 rpm, durante 1 h. A continuación, 100  $\mu$ L de la suspensión celular se sembraron en placas LB agar (medio LB suplementado con 20 g/L de agar) conteniendo 50  $\mu$ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich).

Cuando se usaron células electrocompetentes de *E. coli* XL-1 un volumen de 40  $\mu$ L de las mismas se mezclaron con un volumen de 1-1.5  $\mu$ L del mix de ligación y se incubó en hielo 2 minutos. La mezcla se transfirió a una celda de electroporación y en equipo electroporador (Biorad) se dio un pulso de 2.5 kv durante 5 milisegundos. Rápidamente se adicionó 1 mL de medio LB o SOC (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucosa) y se mezcló por inversión. La suspensión se trasvasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se incubó en shaker con agitación de 180 rpm. Finalmente se sembraron 50-100  $\mu$ L en placas LB o SOC agar conteniendo y 50  $\mu$ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich).

### **Minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps)**

Una colonia aislada (a partir de placa) de *E. coli* DH5 $\alpha$  o XL-1 se transfirió a un tubo conteniendo 3 mL de LB suplementado con 50  $\mu$ g/mL de ampicilina y se incubó overnight a 37°C con agitación de 150 rpm. El contenido se trasvasó a tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugó 30 segundos a 5000 rpm y 4°C, descartándose el sobrenadante. El pellet conteniendo la biomasa se resuspendió en 200  $\mu$ L de TE Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 20 mM pH 8 (solución I). A continuación, se adicionaron 200  $\mu$ L de solución 1% SDS y 0.2 N de NaOH (solución II) y se homogenizó por inversión. Por último, se adicionaron 200  $\mu$ L de 60% acetato de potasio 5M y 11,5% de ácido acético glacial en frío (solución III). La mezcla se centrifugó 15 min a 15000 rpm y 4°C y se colectó el sobrenadante. A continuación, se realizó tratamiento con ARNasa A (Sigma-

Aldrich) para lo cual se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de un stock 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la enzima y se incubó durante 15 min a 37°C. Posteriormente se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se homogenizó y se centrifugó 5 minutos en las condiciones antes descritas. Se recogió la fase superior y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se incubó 15 minutos en freezer (-20°C). A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4°C descartándose el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol 70%, se centrifugó 5 min en las condiciones ya descritas y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM (o en agua mQ). Las muestras se almacenaron en freezer (-20°C).

### **Identificación de la secuencia codificante BGL *I. terricola***

#### ***Espectrometría de masas de BGL *I. terricola****

La proteína previamente purificada (González-Pombo et al., 2011) se analizó mediante SDS-PAGE y el fragmento del gel conteniendo dicha banda se utilizó para la identificación de proteínas por mapeo peptídico con tripsina y medida por MALDI-TOF incluyendo los MS/MS. El análisis fue realizado por el servicio de espectrometría de masas de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo.

#### ***Extracción de ADN***

El ADN genómico (ADNg) de *I. terricola* 0621 se obtuvo mediante diferentes protocolos de extracción (Amberg, Burke, & Strathern 2005; da Silva, Bernardi, Schaker, Menegotto, & Valente, 2012; Harju, Fedosyuk, Peterson, 2004; Tortajada, Martínez-Culebras, Navarro, Monzó, & Ramón, 2009) y por kit comercial YeaStar genomic DNA Kit (Zymo research).

### ***PCR con cebadores degenerados de BGL I. terricola***

En función de los resultados de MALDI-TOF MS/MS, se diseñaron los cebadores degenerados: it\_fw\_D e it\_rv\_D. También se emplearon cebadores degenerados encontrados en bibliografía Dwf, GkLf, GKlr y GLSYr (Quatrini et al., 2008). Las secuencias y *melting temperatures* (Tm) se detallan en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2** Secuencias y Tm de cebadores degenerados para BGL I. terricola.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Referencia
it_fw_D	CARAAYGGNTTYGAYAAY	50.3	Este trabajo
it_rv_D	NCCRATNCCRTTNACCCA	51.9	
Dwf	WTBGTHGTKWCYGA CTGG	52.6	Quatrini et al., 2008
GkLf	CCAWMWGGTMADYTWCCATT CACY	59.1	
GKlr	RGTGAATGGWARWTBACWKWTGG	55.3	
GLSYr	RTARGATARACCATAACCRAA	50.5	

#### ***Programa de PCR utilizado para amplificar con los cebadores diseñados en este trabajo***

Desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 35°C, 45 segundos a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C utilizando Taq Polymerase (Qiagen). Se realizó la reacción de PCR con 200 µM de dNTPs, 0.2 µM de cada cebador, 1 UE y 1x del tampón de reacción en un volumen final de 25 µL. La cantidad de ADNg empleada como molde fue de 20-50 ng,

#### ***Programa de PCR utilizado para amplificar con los cebadores según Quatrini et al., 2008***

Desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 40°C, 45 segundos a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C utilizando Taq Polymerase (Qiagen). Se realizó la reacción de PCR con 200 µM de dNTPs, 0.2 µM de cada cebador y 1 UE, 1x del tampón de

reacción en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . La cantidad de ADNg empleada como molde fue de 20-50 ng.

### ***Ligación de productos de PCR en vectores T***

Los productos purificados fueron clonados en el vector Topo-TA *cloning kit* (Thermo Fischer) (Ver Anexo). Para ello, un volumen de hasta 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR se incubó con 1  $\mu\text{L}$  de solución salina, se llevó a 6  $\mu\text{L}$  con agua destilada (libre de nucleasa) y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  del vector. La mezcla de ligación se incubó 1h a temperatura ambiente y a continuación, 16 hs en heladera (4°C).

### ***BLASTp de la secuencia codificante de BGL***

Este trabajo formó parte de la Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas de la Lic. Juliette Dourron (Dourron, 2020). Las secuencias de proteínas anotadas como BGLs de levaduras en la base de datos NCBI fueron descargadas (búsqueda realizada el 21 de agosto de 2018, término de búsqueda: beta glucosidase Yeast, Filtros: Species= “Fungi”, “Ascoymycetes”, “Budding yeasts” y Source databases=RefSeq, Base de datos “Proteins”). Se utilizó el programa Blast (blastp 2.6.0+) para buscar homología de estas secuencias con las proteínas anotadas, utilizando los parámetros e-value 1e-5, -maxtarget seq 1 y demás parámetros por defecto. A partir de la anotación funcional realizada con InterProScan, se identificaron aquellas enzimas a las cuales les fue asignado el término “ $\beta$ -glucosidase”. Una vez identificadas las BGLs de *I. terricola*, la secuencia codificante de la BGL de interés se identificó gracias a los datos de espectrometría de masas.

***Amplificación de la región codificante del gen de BGL >g4180 de I. terricola por PCR, con cebadores específicos***

Las secuencias y T<sub>m</sub> de los cebadores específicos para amplificación de la secuencia codificante del gen BGL >g4180 *I. terricola*, se detallan en la **Tabla 3.3**.

**Tabla 3.3.** Secuencias y T<sub>m</sub> de cebadores específicos para BGL *I. terricola*.

Cebador	Secuencia 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)
bgl-it-Fw	ATGAAATTATCCACATTCATTTAC	59
bgl-it-Rv	TAAGAATCATAGCCACATTGGTTA	61

El mix de reacción contenía 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 0.2  $\mu\text{M}$  de cada cebador y 0.5 UE de Kapa HI Fi DNA polymerase (Kapa Byosystems), 1x del tampón de reacción en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . La cantidad de ADN<sub>g</sub> empleada como molde fue de 20-50 ng.

Las condiciones de PCR fueron: 3 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

***Ligación de productos en vectores blunt***

La secuencia codificante de BGL >g4180 *I. terricola* (ver Anexo) fue clonada en vector Zero blunt (Thermo Fischer Scientific) (Ver Anexo). Para ello, un volumen de  $\leq 4 \mu\text{L}$  del producto de PCR purificado, se incubó con 1  $\mu\text{L}$  de solución salina y se completó hasta 5  $\mu\text{L}$  con agua destilada. Se añadió 1  $\mu\text{L}$  vector pCR-II-Blunt-TOPO a la mezcla y se incubó 1h a temperatura ambiente y posteriormente, 16 hs en heladera.

La mezcla de ligación se utilizó para transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y posteriormente, se procedió a la obtención de minipreparaciones de ADN las cuales fueron enviadas a secuenciar, tal como se describió previamente.

## Co-transformación de *S. cerevisiae* T73-4

### Condiciones de PCR de fusión

En la **Tabla 3.3** se muestran los cebadores diseñados para ser usados en PCR tradicional y de fusión. Los fragmentos ADH1p (1467 pb), ACT1p (1251pb), CYCt (250pb), ENDpBGL (2337 pb), BGL (1290 pb) serían a continuación usados en la PCR de fusión.

**Tabla 3.4** Cebadores para generación de productos de fusión

CEBADOR <i>FORWARD</i>	CEBADOR <i>REVERSE</i>	PRODUCTO AMPLIFICADO	Referencia
ADH_fw ATATTACCGCGGAGGGGGATCGAA GAAATGA	ADH_Rv TGTGTATATGAGATAGTTGATT GTATGCTTGG	Promotor ADH	Partow et al., 2010
ACT_Fw ATATTACCGCGGCCCTCAATATTTCT CTGTCACC	ACT_Rv TGTTAATTCAGTAAATTTTCG ATCTTG	Promotor ACT	Bai Flagfeldt et al., 2009
CYC_fw CGATATCATGTAATTAGTTATGTCAC GC	CYC_Rv ATAATCCCGGGGCAAATTAA AGCCTTCGAGC	Terminador CYC	Bai Flagfeldt et al., 2009
END_bglu_fw ATATTACCGCGGATGCGAAAAGCAC AATTTCC	CYC1_bglu_rv <u>GCGTGACATAACTAATTACAT</u> <u>GATATCGCTAAGAATCATAGC</u> CACATTGGTTAG	BGL con su promotor (endógeno) y "cola" para extremo 5' CYC	Este trabajo
ADH+bglu_fw <i>CCAAGCATACAATCAACTATCTCATA</i> <i>TACAATGAAATTATCCACATTCATTT</i> CACTGA		BGL con "colas" para extremos 3' de ADH y 5' de CYC	Este trabajo
ACT+bglu_fw <i>CAAGATCGAAAATTTACTGAATTAA</i> <i>CAATGAAATTATCCACATTCATTTCA</i> CTG		BGL con "colas" para extremos 3' de ACT y 5' de CYC	Este trabajo

\*En negrita y subrayado se indican los sitios de corte de ScaII (CCGCGG) en los cebadores ADH\_fw, ACT\_fw y END\_bglu\_fw y el sitio de corte de XmaI (CCCGGG) en el cebador CYC\_Rv.

\*En los cebadores ADH\_bglu\_fw y ACT\_bglu\_fw se indica en cursiva y subrayado las "colas" que hibridan con los extremos 3' de ADH y ACT, respectivamente.

\*En CYC1-bglu-Rv se indica subrayado la "cola" que hibrida con el extremo 5' de CYC1

El programa de PCR de fusión consistió en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C de; 9 ciclos de: 20 segundos a 98°C, 15 segundos a 65°C y 210 segundos a 72°C y 14 ciclos de 20 segundos a 98°C, 15 segundos a 65°C y 210 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos. El mix de reacción contenía: 1x del tampón de reacción, 0.5 UE de Kapa HiFi, 200 μM de dNTPs, 0.2 μM de

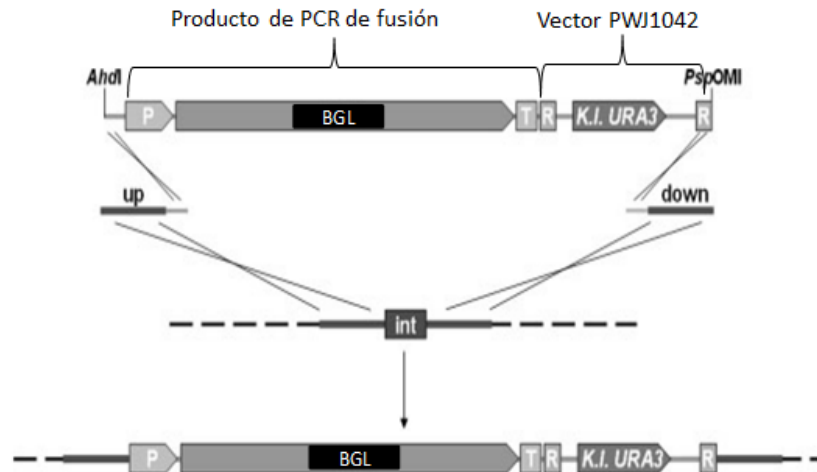
cada cebador (**Tabla 3.4**) y 30-100 ng de material genético en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  con agua mili Q.

### ***Digestión y purificación de los productos de fusión***

Los productos de fusión ([ver Anexo](#)) fueron digeridos con enzimas de restricción SacII y XmaI (NEB), al igual que el vector PWJ1042 ([ver Anexo](#)), cortesía de Dr. Jens Nielsen, Dpto de Ingeniería Química y Biológica, Universidad Tecnológica de Chalmers, Gotemburgo, Suecia). Las digestiones se realizaron con 1  $\mu\text{L}$  de la(s) enzima(s), 2  $\mu\text{L}$  del tampón 10x correspondiente (según la enzima) y hasta 1  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir, llevando a volumen final de 20  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasa. Luego de la incubación de 4 hs a 37°C, los productos fueron purificados.

### ***Ligación en vector PWJ1042 y purificación de cassettes para co-transformación***

Los productos de fusión y el vector digeridos fueron usados en la reacción de ligación con ligasa de ADN T4 (NEB). Para ello, se hizo un mix conteniendo 2  $\mu\text{L}$  del buffer de ligasa 10x (NEB), 50 ng del vector digerido, 40 ng de inserto (productos de fusión digeridos), agua libre de nucleasa hasta 20  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima. Las mezclas de ligación se incubaron durante 1h a temperatura ambiente y a continuación, 16 hs en heladera. Se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se seleccionaron las transformantes y se hicieron minipreparaciones de ADN plasmídico las cuales fueron purificadas y enviadas a secuenciar. Una vez confirmadas las secuencias de los productos de fusión, los *cassettes* se generaron mediante digestión (**Figura 3.3**) y se purificaron.



**Figura 3.3.** Esquema de la generación completa del cassette con la primera porción generada mediante PCR de fusión conteniendo promotor, BGL y terminador (p::BGL::t) introducida en el vector PWJ1042 y digerida con AhdI y PspOMI. Adaptado de Bai Flagfeldt et al., 2009.

### Condiciones de PCR de fragmentos para co-transformación

Para los fragmentos up (690 pb) y down (651 pb) las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C seguido de 25 ciclos de: 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 72°C y una extensión final de 5 minutos. En la **Tabla 3.5** se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

**Tabla 3.5** Cebadores para fragmentos up y down

CEBADORES	SECUENCIA 5'-3'	Referencia
Up_Fw	GCCAGGCGCCTTTATATCAT	
Up_Rv	<u>CCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGT</u> TTTTGCGAAACCCTATG CTCT	Bai Flagfeldt et al., 2009
Down_Fw	<u>TAAGAATTGTCGTTTCATGGTGACACA</u> ATGGAAGGTCCGGAT GAG	Bai Flagfeldt et al., 2009
Down_Rv	ATAAAGCAGCCGCTACCAAA	

\*En Up\_Rv se indica en cursiva y subrayado, la "cola" complementaria y reversa al extremo 5' del cassette.

\*En Down\_Rv se indica en cursiva y subrayado, la "cola" complementaria al 3' del cassette.

Los cassettes, conteniendo promotor (ADHp o ENDp), la secuencia codificante de BGL, el terminador CYCt y el gen URA3 de *K. lactis*, y los fragmentos up y down, se usaron a continuación para co-transformación de *S. cerevisiae* T73-4.



### ***Preparación de células quimiocompetentes y co-transformación de *S. cerevisiae* T73-4***

Una colonia de *S. cerevisiae* T73-4 se cultivó *overnight* en 10 mL de YPD. Luego se largó un cultivo con Abs 600 nm inicial de 0.1 y se monitoreó hasta que éste alcanzó una Abs 600 nm de 0.7. Las células se centrifugaron 3 minutos a 5000 xg. A continuación, se realizó un lavado con 25 mL de agua destilada estéril y se re-centrifugaron las células y se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL resuspendiendo en un volumen final de 1 mL con agua destilada estéril y se alicuotaron de a 100  $\mu$ L en tubos eppendorf de 1.5 mL.

Para el mix de co-transformación se adicionaron 240  $\mu$ L polietilenglicol (PEG) al 50%, 36  $\mu$ L de acetato de Litio 1M, 10  $\mu$ L ADN *carrier* (esperma de salmón) previamente hervido, una cantidad  $\geq 2$   $\mu$ g del material genético (*cassettes* y fragmentos up y down) y se completó con agua mQ estéril a volumen final de 360  $\mu$ L.

Alícuotas de células se centrifugaron para descartar el sobrenadante y se le adicionó el volumen total del mix de co-transformación. La mezcla se homogeneizó mediante vortex y se incubó 40 minutos a 42°C. A continuación, se dio un *spin* de centrifuga, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua mQ y se plaqueó el total en placas SDA Ura-: 6.7 g/L de YNB s/aminoácidos, 0.6 g/L de Complete Supplement Mixture (CSM) sin Uracilo, 20 g/L de glucosa, 20 g/L de agar. Se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en el medio en ausencia de uracilo.

## **Transformación de *S. cerevisiae* T73-4 con vectores de expresión**

### ***Clonado de productos de fusión en vector pESC-URA***

Los productos de fusión ADHp::BGL::CYCt y ENDpBGL::CYCt, generados como se describió anteriormente, fueron liberados del vector pWJ1042 mediante digestión con SacII y XmaI (NEB). A continuación, fueron ligados al vector de expresión pESC-URA (previamente digerido con las mismas enzimas). El mix de ligación se empleó para la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* XL-1. La verificación del inserto se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, de las minipreparaciones de ADN previamente digeridas con las mismas enzimas de restricción SacII y XmaI. De esta manera se generaron los vectores: pESC-URA-ADHpBGL y pESC-URA-ENDpBGL.

### ***Preparación de células electrocompetentes de *S. cerevisiae* T73-4***

Para la preparación de las células electrocompetentes a partir de 1 colonia de *S. cerevisiae* T73-4 en YPD agar se realizó un pre-cultivo de 5 mL en YPD el cual se incubó overnight a 28°C y 200 rpm. A continuación, se tomó una alícuota de 1 mL del pre-cultivo y se inoculó a 100 mL de YPD en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se monitoreó Abs 600 nm hasta alcanzar una lectura de 1.2-1.5. Las células fueron enfriadas en hielo durante 15 minutos y centrifugadas a 3000 xg y 4°C, durante 5 min. El sobrenadante del cultivo se descartó y las células (pellet) se lavaron dos veces con 50 mL con agua estéril fría. Las células se centrifugaron en las condiciones descritas previamente, y se resuspendieron en 4 mL de Sorbitol 1 M frío. A continuación, se transfirieron a un tubo de centrifuga (Falcon) de 15 mL y se centrifugaron nuevamente. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 100 µL de Sorbitol 1 M frío y permanecieron en baño de hielo hasta su uso (el cual se hizo de forma inmediata).

### ***Transformación de células electrocompetentes de *S. cerevisiae* T73-4 por electroporación***

Las construcciones para la transformación se obtuvieron mediante digestión de pESC-URA-ADHpBGL y pESC-URA-ENDpBGL con la enzima NotI (NEB). La digestión se realizó *overnight* a 37°C. A continuación, los vectores linealizados se purificaron. Este material genético fue usado directamente en la transformación de las células electrocompetentes de *S. cerevisiae* T73-4.

Una cantidad  $\geq 2 \mu\text{g}$  de las construcciones digeridas (linealizadas) se transfirieron a tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles y se adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de células electrocompetentes a cada uno, homogeneizando levemente. La mezcla se incubó en hielo durante 5 minutos y se transfirió a cubetas de electroporación previamente enfriadas. En electroporador (BioRad) se descargó un pulso de 1.5 kv durante 4 ms. Inmediatamente después se adicionaron 960  $\mu\text{L}$  de YPD a temperatura ambiente y el contenido total se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles. Las células se incubaron 1 h a 30°C y 200 rpm. A continuación, el contenido se centrifugó a 7000 rpm y 4°C, durante 2 minutos. Las células se lavaron con una solución 13.4 % m/v de YNB sin aminoácidos, se centrifugaron en las mismas condiciones y se resuspendieron en 1mL de la misma solución. Se sembraron 100  $\mu\text{L}$  en placas SDA Ura-. A continuación, al contenido remanente del tubo eppendorf se le dio un *spin*, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en un mínimo volumen (aprox 100  $\mu\text{L}$ ) y el contenido concentrado se plaqueó en SDA Ura -.

Como control positivo de transformación el mismo procedimiento se realizó con el vector pESC-URA linealizado, sin inserto. Adicionalmente, como control negativo se realizó la transformación sin el agregado de ADN. Las placas fueron incubadas por un mínimo de 48 hs a 30°C.

### ***Verificación de las transformantes de *S. cerevisiae* T73-4***

La verificación de las transformantes se realizó mediante PCR de colonia. Se preparó un lisado celular resuspendiendo una colonia aislada en 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se adicionó 5 UE/ $\mu\text{L}$  de liticasa (Lyticase from *Arthrobacter luteus*-Thermo). La mezcla se incubó 10 minutos a 30°C y a continuación, se incubó 10 minutos a -80°C. Las reacciones de PCR se realizaron en las condiciones ya optimizadas, utilizando como molde el lisado celular.

### ***Evaluación de la expresión BGL >g4180 en las transformantes de *S. cerevisiae* T73-4***

Se realizó en medio EGA a pH 4.0 y 5.0. Como control negativo de expresión se empleó la cepa *S. cerevisiae* T73-4 transformada con el vector pESC-URA linealizado, sin inserto. El control positivo fue la cepa nativa *I. terricola* 0621.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

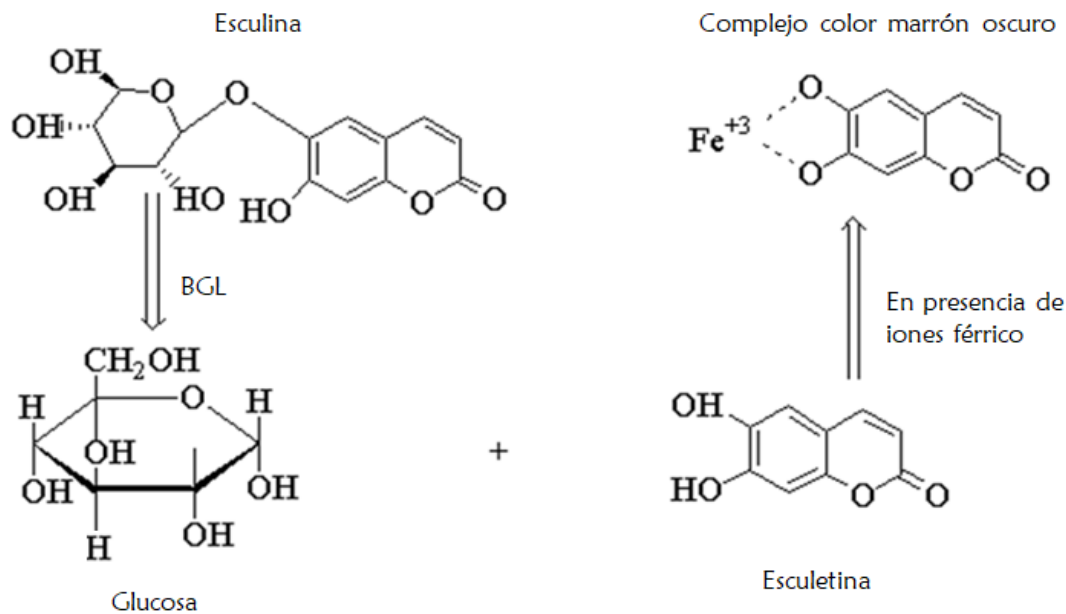
### 4.1 CEPAS NATIVAS PRODUCTORAS DE ACTIVIDAD BGL

Como se mencionó en la Introducción, en condiciones enológicas, la producción de BGLs por parte de las cepas silvestres que conforman el ecosistema enológico no es frecuente. En ese sentido, de una colección de 154 cepas de levaduras nativas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (Laboratorio de enología, Facultad de Química) evaluadas mediante *screening* a pH 6.0 (Pérez et al., 2011), apenas el 20% mostró actividad BGL y la mayoría (70%) eran no-*Saccharomyces*. Asimismo, los resultados reportados por Strauss et al., 2000, muestran la misma tendencia en donde mediante *screening* en placa a pH 5.0 de una colección de 245 levaduras vínicas de géneros no-*Saccharomyces*, solo 8 cepas mostraron actividad BGL y con una producción muy baja (Strauss, Jolly, Lambrechts, & Van Rensburg, 2001). Estos estudios coinciden con reportes donde se ha observado que tanto para hongos filamentosos como para levaduras, la producción de actividad BGL a valores de pH bajos (~4.0), es mucho menor que en el entorno de pH 5.0-5.5 (García-Kirchner, Segura-Granados, & Rodríguez-Pascual, 2005; Ikram-ul-Haqul, Javed, Siddiq, & Saleem, 2006). Estos reportes en conjunto demuestran por un lado, el desafío de hallar cepas enológicas que sean productoras de actividad BGL y aún más, que esto ocurra a bajos valores de pH. Por otro lado, estos estudios también confirman que son pocas las cepas del género *Saccharomyces* productoras de esta actividad.

A continuación, se muestran los estudios de producción de actividad BGL en placa a pH 4.0 y el perfil de crecimiento y producción en cultivos líquidos, de cepas autóctonas aisladas de uvas y mostos de viñedos bodegas nacionales.

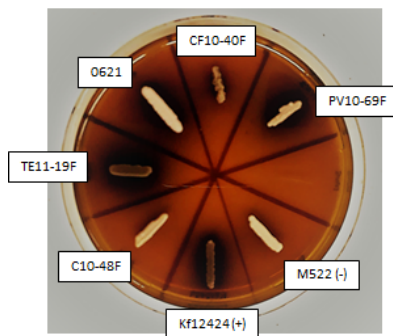
## Producción de actividad BGL en placa

Para el estudio de la producción de actividad BGL en placa se utilizó el medio EGA (del inglés “Esculin Glycerol Agar”). El inóculo del microorganismo a estudiar se cultiva en placa en YPG agar conteniendo esculina (esculetin-6-β-D-glucopiranosido) y una sal de hierro (cloruro férrico). La BGL hidroliza el sustrato a glucosa y esculetina y ésta última forma un complejo de color marrón oscuro con el  $Fe^{3+}$  en solución presente en el medio (**Figura 4.1**). De esta manera, aquellas cepas productoras de actividad BGL revelarán un halo de este color en el entorno de su crecimiento (Mahadevan & Eberhart, 1964; Pérez et al., 2011).



**Figura 4.1.** Esquema de actividad BGL en esculina y formación del complejo color marrón oscuro. Adaptado de Ahmed et al., 2017

Considerando la importancia de hallar cepas enológicas que sean productoras de actividad BGL a pH bajos, se estudió la producción a pH 4.0 (**Figura 4.2**, **Tabla 4.1**) algo que no había sido estudiado hasta el momento, para estas cepas.



**Figura 4.2.** Screening en placa agar esculina, pH 4,0, 72 hs de incubación a 28°C. Se evaluaron las cepas de *I. terricola*: 0621, PV10-69F, C10-48F, CF10-40F y TE11-19F de *I. orientalis*.

**Tabla 4.1.** Se muestra la producción de actividad BGL en placa, para las cepas seleccionadas.

Cepa	Producción (halo)
<i>Issatchenkia terricola</i> 0621 (referencia)	+++
<i>Issatchenkia terricola</i> CF10-40F	++
<i>Issatchenkia terricola</i> C10-48F	+
<i>Issatchenkia terricola</i> PV10-69F	+++
<i>Issatchenkia orientalis</i> TE11-19F	+++
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ATCC 12424 (Control+)	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M522 (Control-)	No detectado

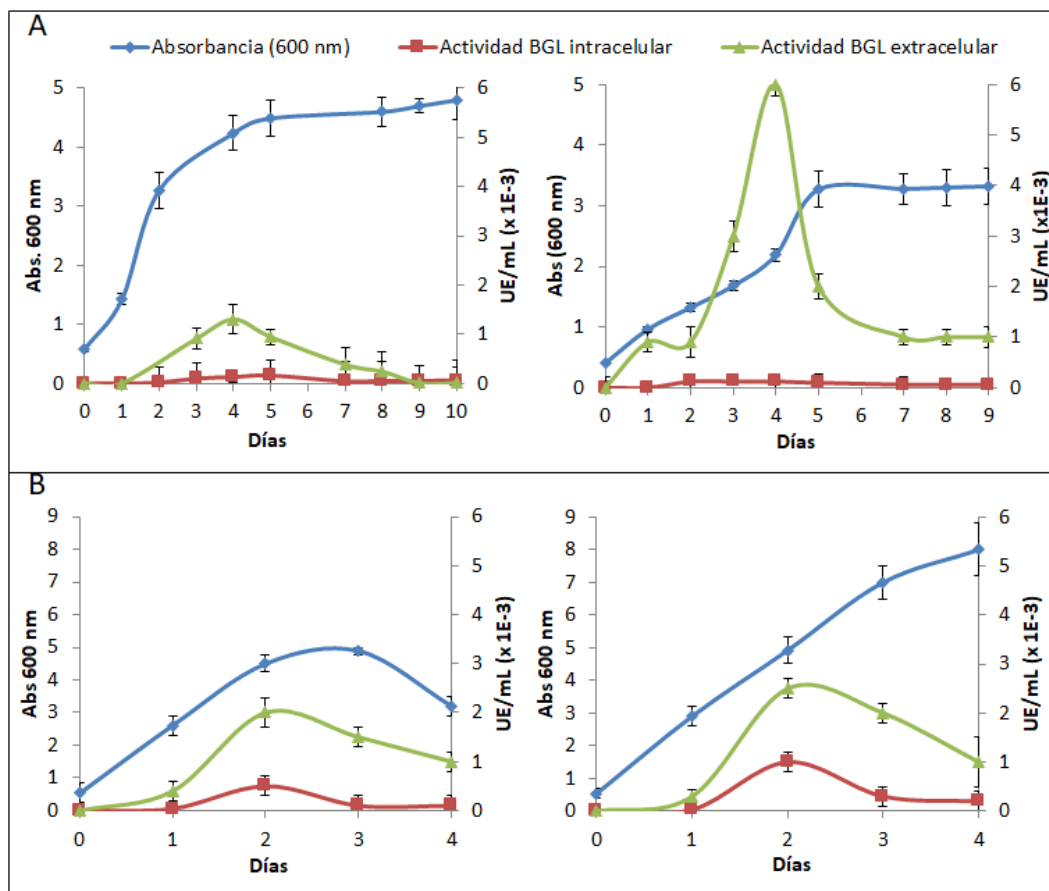
Puede observarse que, las cepas de *I. terricola* CF10-40F y C10-48F fueron las menos productoras en esa condición, con halos apenas perceptibles (Figura 4.2, Tabla 4.1). Por otro lado, las cepas de *I. terricola* PV10-69F e *I. orientalis* TE11-19F se destacaron en la producción de actividad BGL con intensidad de halos comparables al control positivo (Figura 4.2, Tabla 4.1) e incluso similares a lo obtenido para la cepa productora de BGL de referencia, *I. terricola* 0621 previamente estudiada (González-Pombo, 2010). Por lo tanto, se seleccionan las cepas *I. orientalis* TE11-19F e *I. terricola* PV10-69F, aisladas de la fermentación de uva Tempranillo y Petit verdot respectivamente, para optimizar las condiciones de producción de BGL.

### **Cinética del crecimiento y producción de BGL *I. orientalis* TE11-19F e *I. terricola* PV10-69F**

En la obtención de enzimas microbianas es importante conocer los parámetros de producción tales como la composición del medio (fuente y concentración de carbono, nitrógeno, oligoelementos) así como las condiciones del cultivo (el pH inicial, temperatura, disponibilidad de oxígeno, tiempo de producción, tamaño del inóculo inicial), entre otros. En cuanto a la producción de BGLs de levaduras es frecuente el uso de medio ricos en nutrientes, como YP (extracto de levadura y peptona) conteniendo distintas fuentes de carbono tales como glucosa, glicerol,

celobiosa, sacarosa, entre otras (Baffi et al., 2011; González-Pombo, Fariña, Carrau, Batista-Viera, & Brena, 2011). Los sustratos disacáridos naturales tales como celobiosa o lactosa pueden ser inductores y en general, la temperatura de máxima producción coincide con la óptima de crecimiento del microorganismo (Ahmed et al., 2017).

Los resultados del perfil de crecimiento y producción de actividad BGL *I. orientalis* TE11-19F e *I. terricola* PV10-69F se muestran en la **Figura 4.3**.



**Figura 4.3.** Curvas de crecimiento (Abs 600 nm) y producción de actividad BGL para *I. orientalis* TE11-19F (A) e *I. terricola* PV10-69F (B). A la izquierda (izq.) en medio YPG y a la derecha (der.), en YPG suplementado con 20 g/L de celobiosa. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer, a pH 5.0 y 180 rpm de agitación.

Ambas cepas secretaron actividad BGL, en las diferentes condiciones ensayadas (**Figura 4.3**). En cuanto *I. orientalis* TE11-19F, se observó que la presencia de 20 g/L de celobiosa) incrementó seis veces la actividad BGL, alcanzándose una máximo de  $6 \times 10^{-3}$  UE/mL (**Figura 4.3A, der.**) y disminuyó el tiempo del máximo de su producción (de 4 a 3 días). En cuanto a la actividad BGL *I. terricola* PV10-



69F, la presencia de 20 g/L de celobiosa no tuvo ningún efecto ( $\sim 2 \times 10^{-3}$  UE/mL en ambos cultivos) y esto coincide con lo observado para la misma especie, cepa de *I. terricola* 0621 de referencia la cual no fue inducible en esa condición. La actividad BGL producida por PV10-69F fue del mismo orden que la cepa 0621 de referencia ( $10^{-3}$  UE/mL) (González-Pombo, 2010). En cuanto a las diferencias observadas de producción de actividad BGL en respuesta a la presencia de celobiosa, por parte de las cepas estudiadas, se ha reportado que si bien la hidrólisis de este disacárido es un paso importante en la degradación de celulosa, no todas las BGLs de levaduras y hongos filamentosos están relacionadas al metabolismo de este polisacárido y por lo tanto, no siempre se observa una respuesta cinética y/o transcripcional (Tsukada, Igarashi, Yoshida, & Samejima, 2006). Es destacable también que la máxima producción de BGL *I. orientalis* TE11-19F en presencia de celobiosa es aproximadamente tres veces superior al máximo observado para *I. terricola* PV10-69F, con o sin celobiosa.

En cuanto al crecimiento, no se observaron diferencias relevantes en el perfil de las curvas y en los máximos alcanzados por *I. orientalis* TE11-19F, en los cultivos con y sin celobiosa (Abs 600 nm de  $\sim 3.5$  y  $\sim 4.5$ , respectivamente). En el caso de *I. terricola* PV10-69F, en cambio, la presencia de 20 g/L de celobiosa prolongó la curva de crecimiento de la levadura encontrándose aun en fase exponencial el cuarto día (**Figura 4.3B, der.**) mientras la misma se encontraba en fase de muerte en el cultivo sin el disacárido (**Figura 4.3B, izq.**). Adicionalmente, el máximo crecimiento alcanzado por *I. terricola* PV10-69F en el cultivo con celobiosa (Abs 600 nm  $\sim 8$ ) es superior al del cultivo sin el disacárido (Abs 600 nm  $\sim 5$ ). Estos cambios en el perfil y crecimiento en la curva de PV10-69F, puede deberse a la mayor disponibilidad de sustrato en el cultivo conteniendo celobiosa.

Como dato adicional se debe mencionar que la especie *I. orientalis* (sinónimos: *Pichia kudriavzevii* y *Candida krusei*, entre otros) se destaca de otras no-*Saccharomyces* por algunas propiedades fisiológicas tales como crecimiento a temperaturas superiores a 40°C, producción de etanol, tolerancia a pH bajos y a la presencia de ácidos orgánicos (Isono, Hayakawa, Usami, Mishima, & Hisamatsu, 2012; Xiao, Shao, Jiang, Dole, & Zhao, 2014). Se han reportado cepas

de *I. orientalis* presentes aún en etapas finales de la fermentación de mostos, debido a que son tolerantes al etanol (Clemente-Jimenez, Mingorance-Cazorla, Martínez-Rodríguez, Las Heras-Vázquez, & Rodríguez-Vico, 2004; Kodama, Nakanishi, Thalagala, Isono, & Hisamatsu, 2013). Todas estas características describen a *I. orientalis* como una especie tolerante a diversas condiciones de estrés típicas de la vinificación. Estos antecedentes y la alta producción extracelular de BGL (inducible con celobiosa) de *I. orientalis* TE11-19F, justifica el estudio de esta enzima para su aplicación enológica, algo que no había sido abordado hasta el momento para ninguna cepa de esta especie.

La nueva cepa de *I. terricola* estudiada (PV10-69F) mostró una producción de BGL del mismo orden que la cepa 0621 de referencia, cuya enzima ha sido previamente caracterizada por nuestro grupo. Como la enzima de la cepa 0621 presenta propiedades enológicas muy promisorias, en esta Tesis se continuó con su estudio, abordando nuevas estrategias para su aplicación enológica.

## **4.2 PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE BGL *I. ORIENTALIS***

Los procedimientos de purificación de biocatalizadores son costosos y desde el punto de vista industrial, el valor del producto muchas veces no logra compensar los costos de obtención de las enzimas puras (Castañeda, 2019). Sin embargo, en comparación con los extractos crudos, el uso de biocatalizadores purificados es esencial para su correcta caracterización (pH y temperatura óptima, estabilidad, etc) y posibilita seleccionar enzimas específicas para una aplicación biotecnológica. Numerosas BGLs de microorganismos han demostrado ser poco estables en condiciones vnicas (pH ácido, presencia de glucosa y etanol) por lo que para su aplicación deben plantearse alternativas para su estabilización (Barbagallo et al., 2004; Belda et al., 2017; Michlmayr et al., 2010). Una alternativa simple y muy utilizada para mejorar las propiedades de los biocatalizadores es su inmovilización a soportes sólidos. Se trata de una estrategia que, además de tener el potencial de estabilizar el biocatalizador, permite su reuso, algo muy favorable cuando se trata de procesos industriales a gran escala. En la **Tabla 4.2** se resumen las matrices y metodologías de inmovilización abordadas en este trabajo de tesis.

**Tabla 4.2** Estrategias y mecanismos de inmovilización abordados en éste trabajo

Matriz	Estrategia de inmovilización	Grupos reactivos en la matriz	Mecanismo	Referencia
Co-polímero de metacrilamida (Eupergit C)	Covalente	Epóxido	En dos pasos: 1) adsorción hidrofóbica de la enzima al soporte 2) unión covalente de la enzima al soporte, a través de grupos expuestos SH, OH, NH <sub>2</sub>	Shehata 2017
Agarosa derivatizada (MANAE-Agarosa)	Iónica	Grupos amino resultantes de la activación de la agarosa con glicidol y etilendiamina -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Interacción iónica de grupos cargados negativamente y expuestos en la superficie de la enzima	Brugnari et al., 2018
Nanopartículas de sílica	Atrapamiento	-----	La enzima se adiciona a la mezcla reactiva conteniendo los componentes necesarios para sintetizar el soporte, quedando "atrapada"	Cazaban et al., 2018
	Covalente	Activación de la matriz con glutaraldehído	Formación de base de Schiff entre grupos amino expuestos en la superficie de la enzima grupos funcionales aldehídos (ej. glutaraldehído)	Cazaban, 2014
	Iónica	Funcionalizadas con grupos amino de polietilimina	Interacción iónica de grupos cargados negativamente en la superficie de la enzima con grupos amino de la matriz	
	Iónica y entrecruzamiento		En dos etapas: en la primera, se inmoviliza la enzima en la matriz en forma iónica. A continuación, la enzima inmovilizada se trata con agente entrecruzante (ej. glutaraldehído)	

### Inmovilización de enzimas en nanopartículas (NPs) de sílica biomimética

Las matrices de sílice son materiales porosos que presentan características ideales para su uso en inmovilización debido a su resistencia mecánica y térmica, a la vez que son biodegradables (Bernal, Lopez & Mesa, 2007). En la naturaleza existen matrices de este tipo, como la tierra de diatomeas, que se han usado en la inmovilización de enzimas (Illanes, 2008). Su bajo costo permite viabilizar su uso a gran escala sin que esto conlleve a una gran inversión. Sin embargo, la gran desventaja de la tierra de diatomeas es que se trata de un material altamente fragmentado que consiste en una mezcla heterogénea de biosílica de muchas especies diferentes de diatomeas, lo que dificulta la estandarización de los procesos para su uso industrial (Kröger, Dubey, & Kumari, 2018).

Los materiales de sílice presentan ventajas tales como un elevado grado de resistencia química, física, biológica, una elevada área de superficie disponible y son fácilmente modificables con grupos funcionales. Esto ha motivado la búsqueda y el desarrollo de nuevas y más eficientes matrices con estas características (Cazaban, Wilson, & Betancor, 2016) lo que ha conllevado a un auge de la nanotecnología, desarrollándose diversos materiales entre los que se incluyen nanotubos de silicio (o carbono), nanoanillos y nanopartículas (NPs).

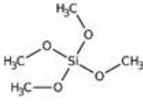
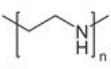
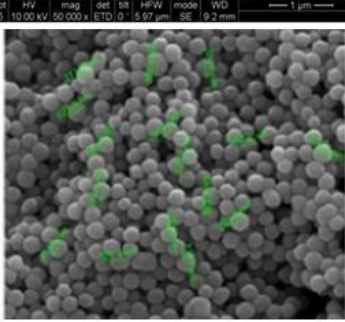
Los materiales nanoporosos son aquellos que poseen poros con dimensiones en la escala nanométrica (1-100 nm). Desde su introducción hace aproximadamente 20 años, se vienen realizando mejoras en las metodologías de obtención de NPs de diversas morfologías, dimensiones, tamaños y estructuras de poros (Nooney, Thirunavukkarasu, Yimei, Josephs, & Ostafin, 2002; Wu, Mou, & Lin, 2013).

En ese sentido, e inspirado en la naturaleza, en las NPs de sílica biomimética, la sílice se sintetiza *in vitro* a través de reacciones derivadas o similares a las que ocurren *in vivo*. Se pueden obtener así matrices nanoestructuradas de excelentes propiedades en medio acuoso, a valores de pH cercanos a la neutralidad y temperatura ambiente (Cazaban, Illanes, Wilson, & Betancor, 2018). En comparación con las técnicas convencionales de activación de matrices e inmovilización, la inmovilización basada en NPs biomiméticas aporta al menos dos atributos importantes. Por un lado, la facilidad en la síntesis de partículas nanométricas de enzimas sin uso de reactivos tóxicos y la posibilidad de adaptar el tamaño de partícula (Ji, Tan, Xu, & Feng, 2012) y además, la simplicidad para co-inmovilizar y generar sistemas multienzimáticos para reacciones en cascada (Cho et al., 2012).

La síntesis de las NPs de sílica se puede optimizar mediante ajustes en las condiciones como el pH, las características de los tensoactivos o co-polímeros utilizados, así como las concentraciones y las fuentes de sílice (Wu et al., 2013). La sílica biomimética puede ser muy versátil para la inmovilización de enzimas ya que permite unir el biocatalizador a la matriz mediante diversas estrategias como ser adsorción, unión covalente o atrapamiento y posterior tratamiento químico como el entrecruzamiento. En la **Tabla 4.3** se muestran las NPs obtenidas

mediante la metodología propuesta por Jackson et al., y las características fisicoquímicas de las mismas (Jackson et al., 2015).

**Tabla 4.3** Características de las NPs sintetizadas.

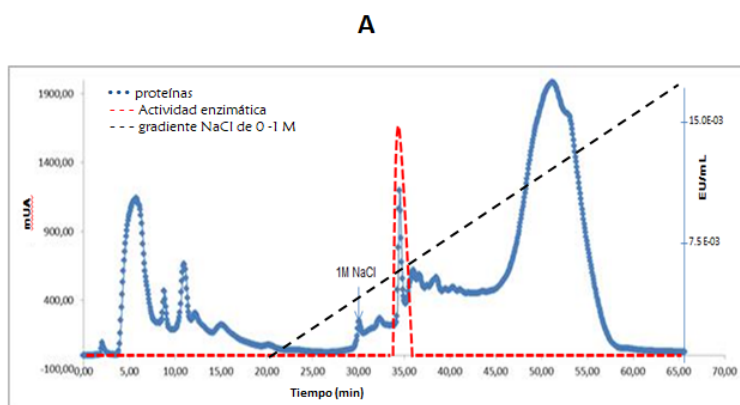
Reactivos	Micrografías de NPs de sílica	Propiedades de las NPs
<div style="text-align: center;">  <p>Tetrametil-orto-silicato</p> <p>+</p>  <p>Polietilenimina</p> <p>+ protefna</p> </div>	<div style="text-align: center;">  </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaños 250-380 nm</li> <li>• Distribución de tamaños homogénea</li> <li>• Elevadas áreas superficiales</li> <li>• Buena estabilidad coloidal</li> </ul>

Adaptado de Jackson et al., 2015

A continuación, se muestran los resultados de purificación de BGL *I. orientalis*, y la caracterización de sus propiedades bioquímicas y enológicas. Como estrategia de uso y de estabilización de la enzima, se recurrió a su inmovilización.

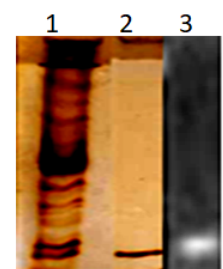
### Purificación de BGL *I. orientalis*

En la **Figura 4.4** se muestra el perfil cromatográfico de intercambio iónico (i.i) de la purificación de la BGL *I. orientalis* a partir del sobrenadante de cultivo precipitado con sulfato de amonio y dializado en tampón acetato de sodio 20 mM pH 6.0. La fracción número 20 eluída a los 35 minutos de la corrida, presentó un pico de actividad ( $15 \times 10^{-3}$  UE/mL) y de proteína (1200 mUA). Mediante electroforesis nativa se evaluó la pureza del eluído en comparación con el extracto crudo (**Figura 4.5**). El perfil electroforético del extracto crudo presenta múltiples bandas de proteínas a diferencia del eluído del i.i., en el cual se observa una única banda intensa y bien definida. La verificación de que se trataba efectivamente de la BGL, se realizó mediante zimograma (sustrato 4-MUG), en donde el Rf de actividad BGL coincide con la banda de proteína purificada mediante intercambio iónico (**Figura 4.5**). Mediante este procedimiento se alcanzó un factor de purificación de 17 y un rendimiento de actividad de 71%. Con la enzima purificada se procedió a la determinación de sus propiedades bioquímicas.



**B**

	UE totales	Proteínas totales (mg)	Actividad específica	Factor de purificación	% rendimiento de actividad
Aplicado	$17 \times 10^{-3}$	2,67	$6,4 \times 10^{-3}$	---	---
Fracción eluída (n 20)	$12 \times 10^{-3}$	0,112	0,11	17	71

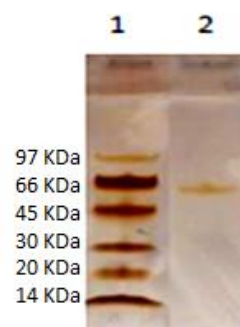


**Figura 4.5.** Electroforesis nativa en gel gradiente 8-25%. Carril 1: extracto aplicado al i.i.; carril 2: eluído de intercambio iónico; carril 3: zimograma (sustrato 4-MUG).

**Figura 4.4. A:** Cromatograma de purificación mediante intercambio iónico en ÄKTA purifier en Columna Mono Q, en tampón fosfato de Sodio (0.1M, pH 6.0). Elución con gradiente salino NaCl de 0 a 1.0 M. ●●● proteínas; - - - Actividad enzimática. **B:** cuadro de purificación de i.i.

## Masa molecular y punto isoeléctrico

La masa molecular de la proteína se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE. Mediante electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras se observó una única banda entre 45-66 kDa (**Figura 4.6**). Mediante cromatografía de exclusión molecular, la masa molecular determinada fue de 58 KDa. En sumatoria, estos resultados nos permitieron concluir que la BGL *I. orientalis* es monomérica y de 58 KDa. El punto isoeléctrico (pI) determinado mediante isoelectroenfoque, fue cercano a 4.0 lo que coincide con varias BGLs de microorganismos cuyos pI corresponden a valores de pH ácidos (Ahmed, Aslam, et al., 2017) tales como BGLs de *A. niger* (pI 3.8-4) y *Candida molischiana* (pI 4.0) (Dan et al., 2000; Tortajada-Serra, 2012).



**Figura 4.6.** Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en gel homogéneo 12.5% . Carril 1: marcador de PM LMW de GE. Carril 2: proteína purificada.

## Actividad en presencia de metales

En concordancia con otras BGLs reportadas previamente (Souza et al., 2010) se observó un incremento en la actividad enzimática en presencia del ion monovalente  $K^+$  (**Tabla 4.4**). Los iones di y trivalentes como  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  mostraron también incrementos significativos en la actividad enzimática, lo que sugiere que estos actúan como ligandos potenciadores de la actividad. Este resultado difiere de lo reportado en bibliografía para algunas BGLs de hongos y



plantas en las que la presencia de iones  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  no presentaron cambios en la actividad enzimática (Chen et al., 2012; Pei et al., 2016). Asimismo, el ion  $Fe^{3+}$  ha sido reportado como un potente inhibidor de algunas BGLs de origen fúngico (Souza et al., 2010). En presencia de  $Zn^{2+}$  la enzima perdió completamente su actividad y este resultado coincide con lo reportado para otras BGLs microbianas en las cuales se observó una drástica disminución de la actividad en presencia de este ion (Oyekola, Ngesi, & Whiteley, 2007). Visto que no se observaron cambios en la actividad de la enzima en presencia de EDTA, puede concluirse que la enzima no es una metalo-proteína dependiente de metales para su actividad, lo que también concuerda con otras BGLs reportadas en bibliografía (Chen et al., 2012; González-Pombo et al., 2008).

**Tabla 4.4** Actividad de la enzima en presencia de metales y EDTA

Sales (10 mM)	Actividad relativa(%)* $\pm$ S.D.
MgCl <sub>2</sub>	119 $\pm$ 25
FeCl <sub>3</sub>	169 $\pm$ 20**
CaCl <sub>2</sub>	146 $\pm$ 30**
EDTA	86 $\pm$ 18
MnSO <sub>4</sub>	123 $\pm$ 7**
KCl	115 $\pm$ 5**
NaCl	111 $\pm$ 15
ZnCl <sub>2</sub>	0 $\pm$ 0**

\*100% corresponde a la actividad relativa (0.1 EU/mL) en ausencia de metales, determinada con pNPG.

\*\*Valores con diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.05$ ).

### Actividad y estabilidad en condiciones enológicas

En presencia de 100 g/L de glucosa (555 mM), equivalente a la concentración de éste azúcar en mostos, la actividad relativa de la enzima fue del 75%. Este resultado presenta una ventaja para su aplicación enológica ya que varias BGLs de microorganismos se inhiben en presencia de glucosa (Barbagallo et al., 2007;

Barbagallo et al., 2004). A modo de ejemplo, la preparación comercial de BGL de *A. niger* (Novozyme 188), retuvo apenas el 26% y 5% en presencia de 100 y 500 mM de glucosa, respectivamente (da Silva et al., 2019; Uchima, Tokuda, Watanabe, Kitamoto, & Arioka, 2012). Se ha reportado que la inhibición por glucosa de las BGLs es competitiva, es decir la unión del inhibidor al sitio activo evita la unión del sustrato, comprometiendo así la catálisis. (Barbagallo et al., 2007; da Silva et al., 2019).

Con respecto al etanol, la actividad de la BGL *I. orientalis* no se vio afectada en presencia de concentraciones de etanol en el rango de 10-40% v/v, observándose un efecto potencialmente inhibitorio a concentraciones superiores al 40 % v/v (Figura 4.7). Kudo et al. observaron que a 20% v/v de etanol, la BGLA de *A. oryzae* retuvo menos del 40% de su actividad mientras que la BGLJ se inactivó por completo (Kudo, Watanabe, Ujiie, Shintani, & Gomi, 2015). El efecto del etanol como inhibidor de la actividad de estas enzimas se ha estudiado principalmente en el contexto de producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. Allí, las BGLs están involucradas en la etapa de hidrólisis de celobiosa a monómeros de glucosa por lo que es de interés conocer si se inhiben por el producto de la fermentación. Se ha observado que la inhibición en este caso es no competitiva, ejerciendo el etanol su efecto inhibitorio por unión a la enzima y al complejo enzima-sustrato (Ghosh, Pamment, & Martin, 1982).

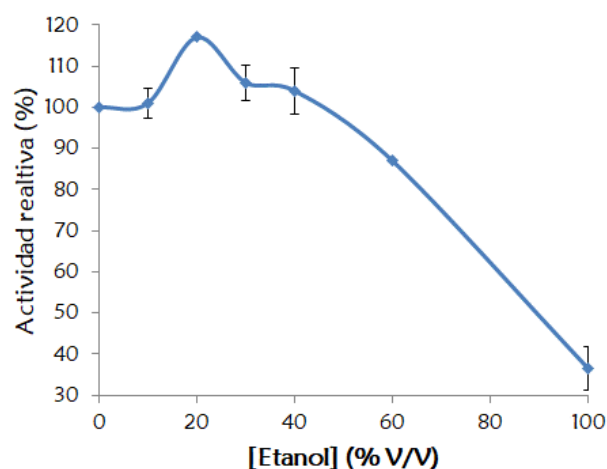
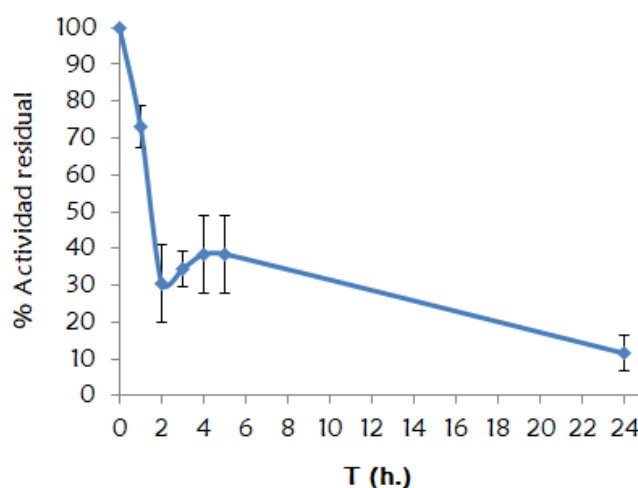


Figura 4.7. Actividad relativa (%) de BGL de *I. orientalis* en presencia en 0-100% v/v de etanol

Este resultado es una ventaja para su aplicación incluso en vinos con elevada concentración alcohólica, que ocasionalmente pueden superar el 18% v/v. A 20% v/v de etanol se observa un incremento en la actividad enzimática del 20%. Esto podría deberse a que en ambientes con elevadas concentración de alcoholes y cantidades relativamente bajas de agua, las BGLs pueden actuar como glicosil-transferasas siendo los alcoholes los aceptores durante la catálisis y esto resulta en velocidades elevadas de liberación de la agliconas (Harnpicharnchai, Champreda, Sornlake, & Eurwilaichitr, 2009; J. J. Mateo & Andreu, 2020). Este resultado coincide con el de otras BGLs reportadas tales como, BGL *Aureobasidium pullulans* que incrementó en un 15% su actividad en presencia de 7.5% (v/v) etanol y BGLs *Stereum hirsutum* y *Aspergillus sp.* las cuales mostraron incremento del 30% en sus actividades en presencia de 5 y 15% v/v de etanol, respectivamente (Mateo & Andreu, 2020).

La enzima mostró muy baja estabilidad en vino sintético a pH 4.0, perdiendo el 50% de su actividad en un tiempo menor a 2 hs (**Figura 4.8**). Este resultado está en concordancia con reportes de otras BGLs (Belda et al., 2017) y coincide con lo reportado por nuestro grupo para BGL *I. terricola*, la cual en la misma condición tuvo una vida media de 2 h (González-Pombo, Fariña, Carrau, Batista-Viera, & Brena, 2011).



**Figura 4.8.** Estabilidad de BGL *I. orientalis* en vino sintético (pH 4.0) y temperatura ambiente

En la **Tabla 4.5** se resumen los resultados obtenidos en cuanto a actividad y estabilidad de la BGL *I. orientalis* en condiciones enológicas. La enzima no se vio afectada en presencia de 100 g/L de glucosa y 20% v/v de etanol lo que sugiere que podría ser usada tanto en mostos como en vinos. Considerando la baja estabilidad de la enzima a pH ácido (4.0), se planteó la inmovilización de la enzima como estrategia de estabilización para posibilitar su uso directo en vinos. Adicionalmente, la inmovilización tiene el potencial de permitir el reúso, facilita el control de la velocidad de hidrólisis y la separación del biocatalizador del producto final sin recurrir a condiciones que pueden alterar el vino (temperaturas elevadas, precipitación, etc.).

**Tabla 4.5.** Actividad y estabilidad de la enzima en condiciones enológicas

<b>Actividad relativa (100 g/L glucosa)</b>	<b>Actividad relativa (20% Etanol)</b>	<b>Vida media en vino sintético 4.0</b>
75 %	120%	< 2 h

## Inmovilización de BGL *I. orientalis* y caracterización de la enzima inmovilizada

En la **Tabla 4.6** se muestran los resultados de inmovilización mediante las diferentes metodologías y soportes estudiados.

**Tabla 4.6** Inmovilización de BGL *I. orientalis*

Tipo de inmovilización	Soporte	Rendimiento de inmovilización de actividad (%R.I.A.)	Actividad ligada (UE/g soporte)	Eficiencia de inmovilización (% E.I.)	Rendimiento en proteínas (% R.P.)	Factor de estabilidad a pH 4.0
Covalente	Metacrilamida activada con Epóxido (Eupergit C)	79 ± 4	Pre-bloqueo 0,1 Post-bloqueo 0,06	Pre-bloqueo 99±2 Post-bloqueo 63 ± 3	82±3	1
	NPs de sílica activadas con glutaraldehído	80 ± 5	0,09	96 ± 5	83±5	7
Atrapamiento	NPs. sílica	7.0± 0.5	0,02	99 ± 1	≤10	--
Iónica	Agarosa activada con glicidol y etilendiamina (MANAE-Agarosa)	94 ± 6	0,11	98 ± 3	80±5	1
	NPs. sílica (grupos reactivos NH <sub>2</sub> )	99 ± 1	0,10	84 ± 3	84 ± 2	64
	NPs. sílica (grupos reactivos NH <sub>2</sub> ) y entrecruzamiento con glutaraldehído	99 ± 1	0,09	71 ± 3	84 ± 2	240

El rendimiento de inmovilización de actividad (% R.I.A.) = [(UE aplicadas – UE recuperadas en percolados y lavados)/UE aplicadas] \* 100.  
La actividad ligada se corresponden con las UE expresadas por gramo de soporte.  
Eficiencia de inmovilización (% E.I.) = [UE inmovilizadas/ (UE aplicadas – UE recuperadas en percolados y lavados)] \*100.  
Rendimiento en proteínas (% R.P.)= [(mg prot. aplicados – mg prot recuperados en percolado y lavados)/ mg aplicados]\*100.  
Factor de estabilidad a pH 4.0 es la relación entre la vida media (t 1/2) de la enzima inmovilizada vs. soluble. t 1/2 es el tiempo (en h) en el que se alcanza el 50% de la actividad enzimática, en medio vino sintético a pH 4.0 y temperatura ambiente.

Se logró inmovilizar eficientemente la proteína de interés en la gran mayoría de las metodologías y matrices ensayadas (rendimientos de inmovilización del 79-99% y proteínas de 80-84%), a excepción de la inmovilización por atrapamiento en NPs de sílica en la cual, los porcentajes inmovilizados de actividad y proteínas fueron muy bajos (7 y ≤10%, respectivamente).

En cuanto a la eficiencia de inmovilización de la metodología covalente en la matriz epoxi-activada se observó que se expresan solamente el 63% de las UE inmovilizadas, evidenciando una pérdida de actividad cercana al 40%. Esto se debe a las condiciones del bloqueo de grupos epóxido remanentes (toda la noche a 4°C y pH 8.0). En cambio, con NPs. de sílica activadas con glutaraldehído, casi la totalidad de las UE inmovilizadas permanecieron activas (96%). Mediante la

metodología de atrapamiento en NPs de sílica si bien se inmovilizó menos del 10% de la proteína, la misma permaneció activa (99%). En MANAE-Agarosa, prácticamente la totalidad de las UE aplicadas fueron inmovilizadas (94%) y activas (98%), lo que demuestra que las condiciones ensayadas (1 hora a pH 5.5) no comprometieron la actividad de BGL *I. orientalis*. En la inmovilización iónica en NPs. de sílica sin entrecruzamiento y entrecruzadas con glutaraldehído, se observó que un gran porcentaje de la enzima unida se mantiene activa. Sin embargo, el tratamiento con glutaraldehído afectó la actividad enzimática (29%) en comparación a la inmovilización sin entrecruzamiento (16%). Este resultado está de acuerdo con los antecedentes del uso de este agente entrecruzante (Kowalandrobertg & Frederick, 1980). En un estudio realizado por Chui & Wan se reportó que la actividad enzimática era inversamente proporcional a la concentración de glutaraldehído y que el exceso de este agente puede resultar en una distorsión de la estructura de la enzima (Chui & Wan, 1997).

En cuanto a la estabilización de la enzima a pH ácido (4.0) en vino sintético, la enzima mejoró su estabilidad mediante unión a NPs. de sílica a través de interacciones covalentes e iónicas, destacándose notablemente éstas últimas. El entrecruzamiento con glutaraldehído mejoró aún más la estabilidad (factor de 240) con respecto a las NPs no entrecruzadas (factor de 64). La mayor tolerancia en vino sintético a pH ácido de la enzima inmovilizada en este soporte, podría explicarse debido a que las matrices de biosílica generan un ambiente rígido, disminuyendo la flexibilidad de las proteínas allí inmovilizadas, lo que tiene un efecto favorable para la estabilidad enzimática (Song, Jiang, Li, & Wu, 2014). La mayor rigidez de las moléculas inmovilizadas derivada del entrecruzamiento intra- e intermolecular con glutaraldehído las hace más resistentes a los cambios conformacionales, mejorando además, la estabilidad térmica, química y mecánica de las enzimas (Migneault, Dartiguenave, Bertrand, & Waldron, 2004). Si bien se logró incrementar significativamente la estabilidad de BGL *I. orientalis* (factor de estabilidad de 240) este resultado es menor a lo alcanzado para la BGL *I. terricola* en matriz epoxi activada, donde el factor de estabilidad fue de 480 (González Pombo, 2010).

En resumen, la inmovilización efectivamente resultó una estrategia muy valiosa para lograr la estabilización de la enzima en vino sintético pH 4.0. En particular, se destacan los resultados para la enzima inmovilizada mediante interacciones iónicas a las NPs de sílica y entrecruzadas con glutaraldehído. Si bien el tratamiento con el agente entrecruzante comprometió en parte la actividad, la excelente estabilización lograda mejora enormemente el desempeño del biocatalizador inmovilizado.

### Estudio de liberación de la enzima al medio

En la **Tabla 4.7** se muestra el seguimiento del estudio de liberación de la enzima al medio de reacción, *leakage*, respecto a las UE inmovilizadas en NPs de sílica sin entrecruzar y entrecruzadas con glutaraldehído. En vino sintético a pH 4.0 y temperatura ambiente no se observa liberación de la enzima al medio durante los primeros 5 días de incubación, mientras que, a partir del día 7 se observa *leakage* para ambos derivados. Los porcentajes de *leakage* a lo largo de 20 días, fueron notoriamente más altos para el derivado sin entrecruzar (20% UE, 25% proteínas) que los obtenidos con el entrecruzado con glutaraldehído (10% UE, 15% proteínas). Esto refleja que el entrecruzamiento además de mejorar la estabilidad de la enzima al pH permitió obtener un derivado con menor pérdida de la enzima al medio de reacción (**Tabla 4.7**) lo que es concordante con reportes previos (Barbosa, Ortiz, Berenguer-Murcia, Torres, 2014).

**Tabla 4.7.** Estudio de liberación de enzima al medio de reacción (*leakage*) para los inmovilizados en NPs de sílica.

DÍA	Sin entrecruzamiento		Entrecruzado con glutaraldehído	
	% UE ste	% protefna ste.	% UE ste.	% protefna ste.
0	0	0	0	0
3	0	0	0	0
5	0	0	0	0
7	10 ± 1.0	15 ± 1.0	1.0 ± 0	3.0 ± 0.2
10	10 ± 1.0	17 ± 1.0	5.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5
15	13 ± 1.0	20 ± 2.0	7.0 ± 0.9	10 ± 1.1
20	20 ± 2.0	25 ± 2.0	10 ± 1.0	15 ± 1.2

## Caracterización de BGL *I. orientalis* inmovilizada

Se estudiaron las condiciones óptimas de actividad (pH y temperatura) y parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  y  $V_{máx}$ ) tanto para la enzima en solución como inmovilizada. Las condiciones óptimas de reacción de la BGL *I. orientalis* (Figura 4.9) coinciden con las de otras BGLs aisladas de levaduras cuyos rangos de pH óptimos son de 5.0-6.0 y temperaturas óptimas entorno a los 50 °C (Cairns & Esen, 2010). A su vez, como se puede observar también en la Figura 4.9, la inmovilización de la enzima no modificó sus condiciones óptimas de pH y temperatura, con respecto a la enzima en solución. Sin embargo, se observan cambios en el perfil de la curva de temperatura óptima donde la enzima inmovilizada presenta mayor actividad que la enzima en solución, para todas las temperaturas estudiadas.

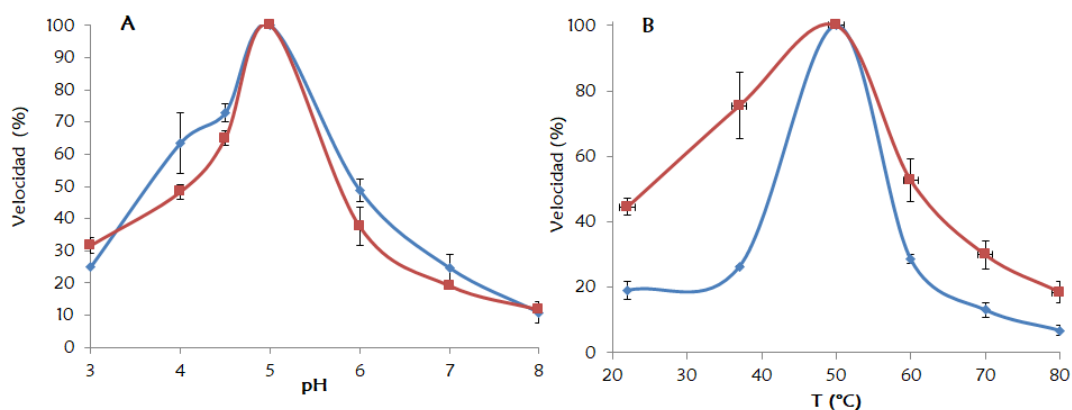


Figura 4.9. Curvas de pH óptimo (A) y Temperatura óptima (B) para la enzima BGL de *I. orientalis* soluble (en celeste) e inmovilizada (en rojo).

Los resultados de la determinación de los parámetros cinéticos de la BGL *I. orientalis* soluble e inmovilizada se reportan en la Tabla 4.8. El valor de  $K_m$  enzima soluble para el sustrato pNPG ( $0.83 \pm 0.03$  mM) es del mismo orden que el de otras BGLs de levaduras no-*Sachharomyces* como *Pichia anomala* ( $0.47 \pm 0.08$  mM) y *Hanseniaspora uvarum* ( $0.61 \pm 0.14$  mM) (Swangkeaw et al., 2011) y menor que el de la BGL *I. terricola* reportada por nuestro grupo ( $4.35 \pm 0.15$  mM) (González-Pombo et al., 2011). Las BGLs son diversas, con parámetros cinéticos variables hacia sus sustratos. Los valores de  $K_m$  para sustratos naturales y algunos sintéticos como pNPG, suelen ser  $\leq 1$  mM, pero pueden variar hasta 1000 veces en diferentes BGLs (Cairns & Esen, 2010). El valor



de  $K_m$  aparente ( $K_{ap}$ ) de la enzima inmovilizada (7.4 mM) fue 9 veces mayor respecto a la enzima soluble (0.83 mM). Esto puede explicarse por restricciones difusionales del sustrato debido a la matriz, impedimentos estéricos en el sitio activo por la unión al soporte, (y/o al glutaraldehído), o por el incremento de la rigidez de la enzima. Varios reportes indican que en general las enzimas inmovilizadas requieren una mayor concentración de sustrato que la enzima libre para una actividad óptima (Poddar & Chandra Jana, 2011; Riaz, Ul Qader, Anwar, & Iqbal, 2009; Varavinit et al., 2002).

Tabla 4.8. Parámetros cinéticos de BGL *I. orientalis* soluble e inmovilizada

ENZIMA SOLUBLE				ENZIMA INMOVILIZADA			
$K_m$ (mM)	kcat (s <sup>-1</sup> )	Kcat/Km (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	V máx ( $\mu$ moles pnP/min.mg)	$K_{ap}$ (mM)	kcat ap (s <sup>-1</sup> )	kcat/Km ap (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	V ap ( $\mu$ moles pnP/min.mg)
0.83	87	1.05x10 <sup>5</sup>	0.05	7.4	17	2.35x10 <sup>3</sup>	0.01

Las constantes catalíticas (kcat) reportadas para las BGLs son relativamente bajas ( $\leq 300$  s<sup>-1</sup>) (Cairns & Esen, 2010). En el caso de la BGL *I. orientalis*, el valor obtenido (87 s<sup>-1</sup>), es del orden de lo reportado para otras BGLs de hongos tales como *A. niger* (66.7 s<sup>-1</sup>) y *Piptoporus betulinus* (96 s<sup>-1</sup>) (Park, Hong, Kim, & Yoon, 2012) y menor que lo reportado para las BGLs I y II de *Trichoderma reesei* (144.4 y 137.7 s<sup>-1</sup>, respectivamente) (Chen, Hayn, & Esterbauer, 1992). Si bien, kcat y  $K_m$  son parámetros cinéticos relevantes que se determinan para una enzima, la relación de estos dos parámetros, kcat/km, conocida como eficiencia catalítica, es la que más se utiliza para comparar enzimas. Para los mejores sustratos se espera un valor alto de kcat y un valor bajo de  $K_m$  por lo que cuanto mayor sea kcat/km, más específica y eficiente será la enzima para ese sustrato (Cairns & Esen, 2010; Mendonça & Marana, 2011). La BGL *I. orientalis* mostró una eficiencia catalítica menor para pNPG (1.05x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) en comparación con las BGLs I y II de *T. reesei* (BGLI=7.93x10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>; BGLII=1.02x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Chen et al., 1992). Por otro lado, la eficiencia catalítica de BGL *I. orientalis* fue superior a lo reportado para las BGLs A y B del hongo basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* (9.38x10<sup>4</sup> y 1.34x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente). Si bien los reportes de cinética de BGLs de levaduras no-*Saccharomyces* son escasos, se observó que

la eficiencia catalítica de BGL *I. orientalis* fue menor que la de BGL de *Candida wickerhamii* ( $7.27 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

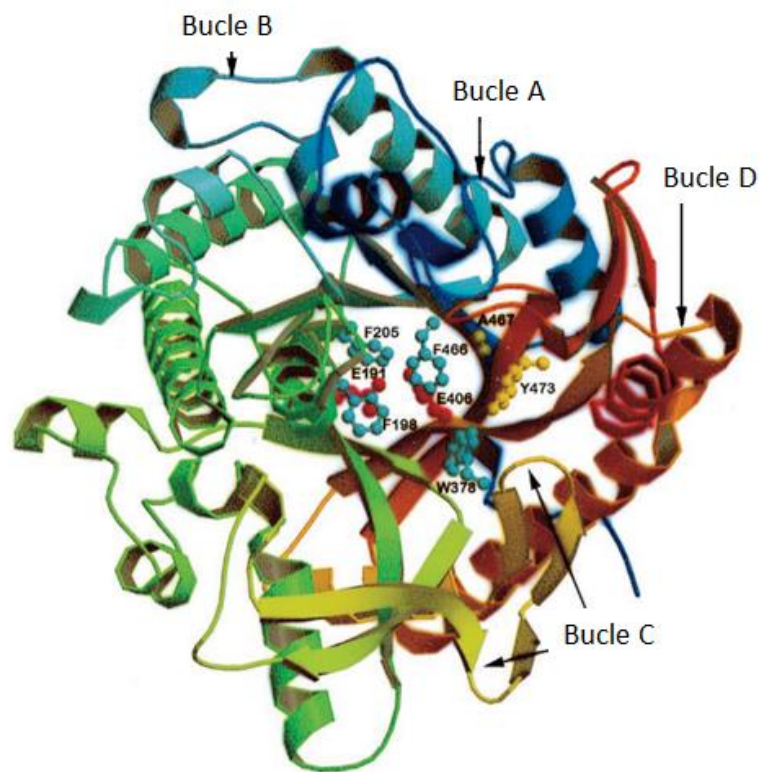
En resumen, en esta Sección se logró la purificación y caracterización bioquímica de BGL *I. orientalis*, observándose que la enzima es activa en presencia de 100 g/L de glucosa y hasta 20% v/v de etanol, pero poco estable a pH 4.0. Esto último mejoró notablemente mediante la inmovilización en NPs de sílica entrecruzadas con glutaraldehído.

### 4.3 ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DE BGLs DE CEPAS NATIVAS

#### Especificidad de enzimas BGLs

Las Glucósido hidrolasas (GH), incluidas las glucosidasas y transglicosidasas, son las enzimas responsables de la hidrólisis y/o transglicosilación de enlaces glicosídicos. Debido a su gran importancia para las aplicaciones biotecnológicas y biomédicas, las GHs constituyen el conjunto de enzimas hasta ahora mejor caracterizadas bioquímicamente, según la base de datos CAZy. Los genes que codifican las GH corresponden a casi la mitad (alrededor del 47%) de las enzimas activas sobre carbohidratos clasificados en CAZy y están presentes en casi todos los genomas (Cantarel et al., 2009). Las BGLs de hongos han sido reportadas mayoritariamente como extracelulares y de la familia GH3, y las de bacterias como intracelulares y de la familia GH1 (Ahmed, Aslam, et al., 2017). Si bien las BGLs de microorganismos y plantas se caracterizan por presentar amplia especificidad de sustrato, lo que resalta la importancia de las funciones biológicas de estas enzimas en estos organismos (da Silva et al., 2019), se han observado diferencias en la especificidad incluso en BGLs estrechamente relacionadas. El primer estudio que reveló que BGLs con secuencias aminoacídicas muy similares diferían en su especificidad de sustrato, fue realizado por Machida et al. 1988. Los autores observaron dos genes de BGLs extracelulares del genoma de *Saccharomycopsis fibuligera*, uno de ellos codificaba para una BGL capaz de hidrolizar celobiosa, mientras que el otro resultó ser una aril- o alquil- BGL (Machida, Ohtsuki, Fukui, & Yamashita, 1988). Este resultado puso de manifiesto las limitaciones para predecir las especificidades y funciones de BGLs, a partir solamente de las secuencias genómicas. El conocimiento de la estructura terciaria, particularmente del sitio activo, en cambio, permite revelar el mecanismo enzimático y la especificidad de sustrato (Singh, Verma, & Kumar, 2016). Los estudios estructurales comparativos entre enzimas salvajes y mutantes son una herramienta muy útil porque permiten obtener información de los residuos involucrados en el reconocimiento de sustratos (Cairns & Esen, 2010). Un estudio cristalográfico de una BGL de maíz (Glu1), permitió identificar que el sitio de

unión a la aglicona se posiciona entre un residuo de triptófano conservado (W378) y tres residuos hidrofóbicos de fenilalanina (F198, F205 y F466). Visto que estos últimos residuos son variables entre BGLs que difieren en su especificidad por el sustrato, el resultado sugirió que estos últimos aminoácidos constituyen la base del reconocimiento y de unión de las agliconas, en otras palabras, de la especificidad del sustrato en estas enzimas (Czjzek et al., 2000). En la **Figura 4.10** se muestra un esquema de la estructura de la enzima GluI de maíz y los residuos involucrados en la catálisis y el reconocimiento de las agliconas.



**Figura 4.10.** Estructura de la  $\beta$ -glucosidasa GluI de maíz que muestra los residuos catalíticos E191 y E406 (en rojo), cuatro residuos (F198, F205, W378 y F466) formando el bolsillo de unión de agliconas (en azul), y otros dos residuos (A467 y Y473) que se presume sean importantes para el reconocimiento de agliconas (en amarillo). Los diferentes colores y las transiciones de color en las  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$  trazan la columna vertebral del polipéptido en la estructura tridimensional en forma de barril desde el extremo Nt (azul oscuro) al extremo Ct (rojo oscuro). Adaptado de Czjzek et al., 2000.

## Relevancia del estudio de la especificidad de BGLs en vinos

La distinción y complejidad de los vinos depende (entre otros factores), de la microbiota de la uva, específica de la región vitivinícola, destacándose aquí la importancia de encontrar microorganismos representativos de cada “terruño” para obtener vinos singulares (Barata & Loureiro, 2012). Como se mencionó en la Introducción, *S. cerevisiae* es incapaz de hidrolizar completamente los precursores glicosídicos durante la fermentación, permaneciendo un reservorio de aromas sin liberar al final del proceso de vinificación. A su vez, se ha observado que el uso de extractos enzimáticos crudos comerciales no representa una solución a la calidad del perfil aromático, debido a que los precursores se hidrolizan indiscriminadamente, lo que puede implicar que se pierda tipicidad (Canal-Llaubères, 2003). Mediante el uso de BGLs de cepas vínicas seleccionadas en cambio, la hidrólisis de precursores de aromas podría ser selectiva y así contribuir a la autenticidad y tipicidad aromática del vino. Delgado et al., 2020 reportaron una BGL de *Halothermothix orenii* que demostró una actividad superior al 60% para geraniol- $\beta$ -D-glucósido y superior al 25% para el guaiacol  $\beta$ -D-glucósido, en comparación con la preparación comercial Rapidase® que apenas alcanzó un 6% de hidrólisis sobre estos sustratos (Delgado, Parker, Fisk, & Paradisi, 2020). Algunas BGLs de levaduras no-*Saccharomyces* como *Pichia anomala*, *Candida molischiana* y *Candida wickerhamii*, han demostrado tener una elevada especificidad hacia precursores de monoterpenos (Swangkeaw, Vichitphan, Butzke, & Vichitphan, 2009). Hu et al., caracterizaron una BGL extracelular de una cepa autóctona de *Rhodotorula mucilaginosa* seleccionada de una región vinícola de China, que mostró una alta especificidad para la hidrólisis de glucósidos de compuestos bencénicos y C13- norisoprenoides (Hu et al., 2016). Estos estudios apoyan la hipótesis de que el uso de enzimas de cepas enológicas seleccionadas podría conllevar a una liberación de aromas más selectiva y es entonces muy relevante contribuir al conocimiento de la actividad y especificidad de nuevas BGLs para su aplicación en enología, algo que no ha sido muy explorado hasta el momento.

## **Breve reseña de las variedades de vinos utilizados en este trabajo**

### ***Moscatel***

Las uvas de Moscatel son las segundas más plantadas en nuestro país, tienen un gran poder aromático, elevado contenido de azúcar y su destino mayoritariamente es como uvas de mesa y no tanto la producción de vinos (INEGI, 2018). Todas las variedades de uvas poseen precursores glicosídicos, pero las Moscatel presentan una elevada proporción de estos compuestos. Las agliconas suelen ser alcoholes lineales o cíclicos, C13-norisoprenoides, fenoles volátiles, además de la elevada proporción de monoterpenos característica de esta variedad (Belancic & Agosin, 2007).

### ***Tannat***

Tannat es una variedad de uva neutra, es la que ocupa la mayor superficie de los viñedos de Uruguay (26.7% del total de la producción) y sus vinos se han consolidado como la principal variedad de nuestro país por su buena adaptación al suelo y al clima. Los vinos Tannat son conocidos en el mercado regional e internacional como “vinos uruguayos” y se caracterizan por tener taninos más suaves y por sus notas a moras (Uruguay XXI, 2015). Mediante hidrólisis enzimática de la fracción de glicósidos, Boido et al., empleando un extracto comercial con múltiples actividades glicosidasas, reportaron que la fracción liberada contenía mayoritariamente compuestos bencénicos (51%), C13-norisoprenoides y monoterpenos (42%) y alcoholes C6 (6%) (Boido et al., 2003).

### ***Cabernet sauvignon***

Cabernet sauvignon es una variedad tinta, neutra que ocupa el 4.5% del total de la producción nacional. Los vinos se caracterizan por contener notas asociadas a frutas rojas tales como moras, ciruelas y otras tales como tabaco cuando el vino

es añejo. Cuando las uvas no alcanzan la plena madurez es usual encontrar notas de pimiento verde, muy características (Cruelles-Borull, 2012; INEGI, 2018). Los compuestos responsables de ese aroma herbáceo típico son las metoxipirazinas, compuestos nitrogenados que provienen del metabolismo de los aminoácidos (Belancic & Agosin, 2007). Hace ya varios años, Francis et al. llevaron a cabo la hidrólisis ácida de la fracción ligada de C. sauvignon observando el incremento de atributos tales como notas de higo seco, tabaco y miel, los cuales relacionaron a compuestos de tipos norisoprenoides, derivados bencénicos, monoterpenos y alcoholes alifáticos (Leigh Francis, Kassara, Noble, & Williams, 1998).

### **Umbrales de percepción y valor de actividad odorante (VAO)**

El umbral de percepción es la mínima concentración necesaria para que un compuesto pueda ser percibido por el olfato humano. La relación entre la concentración y el umbral, se denomina valor de actividad odorante (VAO) y es una medida de la intensidad aromática. Un compuesto será perceptible cuando este valor sea superior o igual a 1, aunque puede tener una contribución sensorial a concentraciones menores, desde 20% de su umbral, es decir cuando su VAO sea  $\geq 0.2$ . (Serrano de la Hoz, 2014). Según los valores de umbrales de percepción, algunos compuestos presentes en cantidades traza pueden contribuir considerablemente al aroma, mientras que otros, mucho más abundantes, pueden tener apenas un ligero aporte al mismo. Los norisoprenoides y terpenos son los que presentan los umbrales de percepción más bajos, y por lo tanto, tienen la contribución más importante al perfil olfativo del vino (Maicas & Mateo, 2005; J. J. Mateo & Jiménez, 2000). Los valores umbrales de los terpenos suelen ser  $\geq 25 \mu\text{g/L}$  mientras que los de norisoprenoides son bastante menores. Para estos últimos es más probable que su impacto en el carácter del vino se dé cuando estos compuestos se encuentran a concentraciones de entre 2 y 10  $\mu\text{g/L}$ . Los norisoprenoides se han descrito como potenciadores de aromas a frutas, pasas secas y notas de ciruela roja, entre otras y están presentes en cantidades similares en todas las variedades (aromáticas o neutras) principalmente bajo forma glicosilada (como monoglucósidos) (Sacks et al., 2012; Sefton, Skouroumounis, Elsey, & Taylor, 2011). En el caso de los monoterpenos, la

variabilidad y cantidad de las formas libres y ligadas es característica de la variedad de la uva, encontrándose en mayor proporción en Moscatel, Riesling, Gewürztraminer y Albariño. Las notas asociadas son florales (rosas, lavanda), herbáceas (tilo) y frutas cítricas (Belancic & Agosin, 2007; Jackson, 2014).

El estudio comparativo del tratamiento con BGLs de levaduras nativas en diferentes variedades de vinos, con diferentes características en cuanto a la disponibilidad y cantidad de precursores de aromas, permitirá inferir sobre la especificidad de estas enzimas así como su potencial aplicación en la liberación selectiva de compuestos aromáticos en vinos.

A continuación, se muestran los resultados de actividad y especificidad de las BGLs de las cepas nativas *I. terricola* 0621 e *I. orientalis* TE11-19F frente a sustratos puros sintéticos, de tipo aril- $\beta$ -D-glucósidos y disacáridos naturales, y frente a sustratos glicosilados, de vinos jóvenes Moscatel, Tannat y Cabernet sauvignon.



## Especificidad hacia sustratos sintéticos y naturales

Los resultados de especificidad de las enzimas BGLs (solubles) de *I. terricola* e *I. orientalis* e frente a sustratos sintéticos (o- y p-nitrofenil glicósidos) y naturales se resumen en la **Tabla 4.9**.

**Tabla 4.9** Especificidad de BGLs de levaduras nativas (expresado en % actividad relativa) frente a sustratos naturales y sintéticos

	Sustrato	Configuración del enlace	BGL <i>I. terricola</i> ± D.E.	BGL <i>I. orientalis</i> ± D.E.
Sintéticos	p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	β (Glc)	100 ± 2	100 ± 2
	o-nitrofenil-β-D-glucopiranosido	β (Glc)	<1	7 ± 2
	p-nitrofenil-α-D-glucopiranosido	α (Glc)	<1	17 ± 3
	p-nitrofenil-α-D-ramnopiranosido	α (Ram)	<1	11 ± 2
	p-nitrofenil-α-L-arabinopiranosido	α (Ara)	5 ± 1	14 ± 1
	p-nitrofenil-β-D-galactopiranosido	β (Gal)	3 ± 5	18 ± 2
	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido	β (Gal)	1.0 ± 0.1	18 ± 1
	p-nitrofenil-α-D-manopiranosido	α (Man)	<1	11 ± 1
Naturales	Celobiosa	(1→4)-β	10 ± 1	18 ± 2
	Maltosa	(1→4)-α	3.0 ± 0.2	25 ± 14
	Sacarosa	α-(1→2)-β	12 ± 1	56 ± 5
	CMC celulosa	(1→4)-β	<1	27 ± 2
	Esculina	(1→6)-β	14 ± 1	31 ± 3

D.E.: desviación estándar.

En relación a los sustratos sintéticos tipo aril-β-D-glucósidos, ambas enzimas presentaron la máxima actividad para el p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido. La BGL *I. orientalis* fue activa sobre los demás sustratos sintéticos, pero su nivel de actividad fue notoriamente menor que frente al pNPG, (7-18%). En cambio, la BGL *I. terricola* fue mucho más selectiva para pNPG, con muy bajos porcentajes de actividad sobre el resto de los sustratos ensayados ( $\leq 5\%$ ). La diferente actividad de ambas enzimas observada frente al pNPG ( $100 \pm 2\%$ ) y al oNPG ( $7 \pm 2\%$  BGL *I. orientalis* y  $\leq 1$  BGL *I. terricola*), glucósidos que solo difieren en la porción aglicona, evidencia la especificidad de estas enzimas hacia esa porción. La comparación de resultados entre pNPG ( $\beta$ -1→4) ( $100 \pm 2\%$ ) y pNPG ( $\alpha$ -1→4) ( $17 \pm 3\%$  BGL *I. orientalis* y  $\leq 1\%$  BGL *I. terricola*), muestra la mayor selectividad de estas enzimas frente a glucósidos de configuraciones tipo  $\beta$ . En tanto, la comparación entre la actividad frente a pNPG ( $\beta$ -1→4) ( $100 \pm 2\%$ ) y pNPGal ( $\beta$

1→4) ( $18 \pm 2\%$  *I. orientalis* y  $3 \pm 5\%$  *I. terricola*) demuestra la importancia del azúcar para los sustratos con enlaces  $\beta$ -glicosídicos. Para aquellos sustratos de configuración  $\alpha$  que difieren en la porción glicona (p-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido, p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinopiranosido, p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido y p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido) se observaron menores diferencias de especificidad: 11-17% en caso de BGL *I. orientalis* y  $\leq 1-5\%$  para BGL *I. terricola*. En resumen, las enzimas mostraron elevada especificidad sobre pNPG ( $\beta$ -1→4), en comparación con otros nitrofenil-glicósidos. Los resultados sugieren además, que tanto la aglicona como el azúcar son relevantes para el reconocimiento de estos sustratos.

Según lo que se observa en la **Tabla 4.9** para los disacáridos naturales, la actividad relativa de la enzima BGL *I. orientalis* frente a celobiosa y maltosa fueron similares ( $18 \pm 2\%$  y  $25 \pm 4\%$ , respectivamente), sugiriendo que para estos sustratos, el tipo de enlace ( $\beta$ 1→4 y  $\alpha$ 1→4) no es relevante para la selectividad de esta enzima. En cambio, la BGL *I. terricola* fue más activa frente a celobiosa ( $10 \pm 1\%$ ) en comparación con maltosa ( $3 \pm 0.2\%$ ). Adicionalmente, la actividad de BGL *I. terricola* sobre celobiosa ( $\beta$ 1→4) y sacarosa ( $\beta$ 1→2) fue similar ( $10 \pm 1\%$  y  $12 \pm 1\%$ , respectivamente), lo que, sumado a la baja actividad ( $3 \pm 0.2\%$ ) frente a maltosa ( $\alpha$ -1→4) indica que la enzima es más selectiva para configuraciones de enlace tipo  $\beta$ . La actividad de ambas enzimas frente a celobiosa no fue preponderante respecto al resto de los disacáridos ensayados, lo que sugiere que estas enzimas no son exclusivamente celobiasas. BGL *I. orientalis* fue activa frente al polisacárido CMC celulosa mientras que BGL *I. terricola* no fue capaz de hidrolizarlo. Este resultado, sumado a la actividad de BGL *I. orientalis* sobre celobiosa sugieren el potencial de la enzima para otras aplicaciones como ser la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos (Isono et al., 2012). En resumen, si bien ambas BGLs mostraron actividad frente sustratos naturales de diferente configuración, en todos los casos la BGL *I. orientalis* fue más activa mientras que BGL *I. terricola* fue más selectiva.

## Actividad y especificidad sobre glicósidos de vinos

A continuación, se evaluó la liberación de aromas en vino sintético con glicósidos de vino Moscatel y en vinos: Moscatel (blanco), Tannat y Cabernet sauvignon (tintos). Para estos estudios que requieren períodos de incubación largos (20 días), se utilizaron las BGLs *I. orientalis* e *I. terricola* estabilizadas mediante inmovilización. La BGL *I. orientalis* se utilizó inmovilizada en NPs de sílica entrecruzadas con glutaraldehído y la enzima de *I. terricola* en Eupergit C 250 L, según González-Pombo et al., 2011. Adicionalmente, el uso de las enzimas inmovilizadas permite separar fácilmente la enzima del producto.

### *En glicósidos aislados de Vino Moscatel blanco*

En la **Tabla 4.10** se muestran los resultados obtenidos en el tratamiento de vino sintético a pH 4.0, adicionado glicósidos de vino Moscatel, analizados mediante GC-MS. Los glicósidos se resuspendieron en un volumen equivalente al de la muestra de vino de partida del cual se realizó la extracción.

**Tabla 4.10** Agliconas identificadas y cuantificadas (mediante GC-MS) para control y tratamientos de vino sintético con glicósidos de Moscatel.

	Compuesto	Control ( $\mu\text{g/L}$ )	BGL <i>I. terricola</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	BGL <i>I. orientalis</i> ( $\mu\text{g/L}$ )
Bencénicos	2-feniletanol	7 $\pm$ 1	5 $\pm$ 3	9 $\pm$ 2
	alcohol bencílico	13 $\pm$ 2	18 $\pm$ 5	15 $\pm$ 3
	<b>Total alcoholes</b>	<b>20 <math>\pm</math> 3</b>	<b>23 <math>\pm</math> 8</b>	<b>24 <math>\pm</math> 5</b>
Fenoles	4-vinilguaiaicol	26 $\pm$ 2a	91 $\pm$ 8 b	90 $\pm$ 5 b
	3,4,5-trimetoxifenol	0 $\pm$ 0 a	13 $\pm$ 2 b	3 $\pm$ 0 a
	4-hidroxi-3-metoxifeniletíl alcohol	0 $\pm$ 0 a	16 $\pm$ 1 c	3 $\pm$ 0 b
	<b>Total fenoles</b>	<b>26 <math>\pm</math> 2 a</b>	<b>120 <math>\pm</math> 11 b</b>	<b>96 <math>\pm</math> 5 b</b>
Norisoprenoides	3-oxo- $\alpha$ -ionol	0 $\pm$ 0 a	22 $\pm$ 2 c	4 $\pm$ 0 b
	3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol	0 $\pm$ 0 a	28 $\pm$ 3 b	0 $\pm$ 0 a
	vomifoliol	0 $\pm$ 0 a	15 $\pm$ 2 c	3 $\pm$ 0b
	<b>Total norisoprenoides</b>	<b>0 <math>\pm</math> 0 a</b>	<b>65 <math>\pm</math> 7 c</b>	<b>7 <math>\pm</math> 0 b</b>
Terpenos	$\alpha$ -terpineol	17 $\pm$ 3	16 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1
	ho-diol (I)	0 $\pm$ 0 a	10 $\pm$ 1b	2 $\pm$ 0 a
	cis-8-hidroxilinalool	0 $\pm$ 0 a	181 $\pm$ 10 c	22 $\pm$ 3 b
	oxido trans-furan linalool	1 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0
	oxido cis-furan linalool	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
	linalool	1 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0
	<b>Total terpenos</b>	<b>20 <math>\pm</math> 3 a</b>	<b>216 <math>\pm</math> 12 c</b>	<b>46 <math>\pm</math> 4 b</b>

a, b y c indican las diferencias significativas mediante ANOVA

En la **Tabla 4.10** se observa que los valores totales de norisoprenoides y terpenos se incrementaron significativamente por ambos tratamientos enzimáticos, destacándose la BGL *I. terricola* por el incremento de norisoprenoides de 0 a 65  $\mu\text{g/L}$  y de terpenos totales de 20 a 216  $\mu\text{g/L}$ . Si bien BGL *I. orientalis* incrementó norisoprenoides y terpenos, los valores alcanzados fueron significativamente menores en comparación a BGL *I. terricola* (de  $0\pm 0$  a  $7\pm 0$   $\mu\text{g/L}$  y de  $20\pm 3$  a  $46\pm 4$   $\mu\text{g/L}$ , respectivamente). En el caso de la BGL *I. terricola*, de resultados previos del grupo ya se conocía su actividad hacia precursores de tipo norisoprenoides y terpenos, en vino Moscatel joven (González-Pombo et al., 2011). Ambas enzimas mostraron actividad frente a glicósidos de 3-oxo- $\alpha$ -ionol y vomifoliol, siendo la BGL *I. terricola* más activa (BGL *I. terricola*  $22\pm 2$  y  $15\pm 2$   $\mu\text{g/L}$  vs BGL *I. orientalis*  $4\pm 0$  y  $3\pm 0$   $\mu\text{g/L}$ , respectivamente). La BGL *I. terricola* fue además activa hacia precursores de 3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol, incrementando su concentración de  $0\pm 0$  a  $28\pm 3$   $\mu\text{g/L}$ . En cuanto a los precursores glicosídicos terpénicos, ambas BGLs hidrolizaron precursores de cis-8-hidroxilinalool, destacándose la BGL *I. terricola* por una mayor especificidad hacia ese compuesto (BGL *I. terricola*  $181\pm 10$  vs BGL *I. orientalis*  $22\pm 3$   $\mu\text{g/L}$ ).

Para los precursores de fenoles ligados, ambas BGLs fueron activas, incrementando significativamente la concentración a  $120\pm 11$  y  $96\pm 5$   $\mu\text{g/L}$ , respectivamente con respecto al control ( $26\pm 2$   $\mu\text{g/L}$ ). Las enzimas mostraron actividad similar frente a precursores de 4-vinilguaiacol (BGL *I. terricola*  $91\pm 8$ , BGL *I. orientalis*  $90\pm 5$   $\mu\text{g/L}$ ). En 3,4,5-trimetoxifenol y 4-hidroxi-3-metoxifeniletal alcohol, la BGL *I. terricola* fue más específica ( $13\pm 2$  y  $16\pm 1$   $\mu\text{g/L}$ ) en comparación con la BGL *I. orientalis* ( $3\pm 0$   $\mu\text{g/L}$  en ambos compuestos). Por último, las enzimas no fueron activas frente a los precursores bencénicos, observándose concentraciones similares al control en todos los tratamientos.

Al finalizar el tratamiento del vino sintético a pH 4.0 con glicósidos, la BGL *I. terricola* retuvo el  $80\pm 8\%$  de su actividad, mientras que la BGL *I. orientalis*  $70\pm 6\%$ .

### *Hidrólisis de compuestos glicosilados totales en vinos*

La determinación del índice Glicosil-Glucosa (G-G) permite estimar la concentración total de glicósidos, mediante la cuantificación directa de la cantidad de D-glucosa liberada por hidrólisis química de la fracción ligada. La cantidad de glucosa liberada es directamente proporcional a la fracción de glicosidos de la muestra, permitiendo así estimar su concentración. Si bien, este ensayo no es específico porque determina el total de glucósidos (no permitiendo correlacionar solo aquellos asociados a aromas), es un estudio preliminar útil que permite establecer si hubo o no hidrólisis debida a los tratamientos (Cid, Goldner, Daz, & Ellenrieder, 2012).

La enzima BGL *I. terricola* fue capaz de hidrolizar más del 60% de los glicósidos en todas las variedades de vinos estudiadas  $66\pm 4\%$  en Moscatel y  $73\pm 3\%$  en Tannat. Para BGL *I. orientalis* los porcentajes de hidrólisis fueron menores ( $45\pm 5\%$  en Moscatel y  $32\pm 3\%$  en Tannat), resaltando la eficiencia de BGL *I. terricola* en la hidrólisis de glicósidos de vino. Los resultados de hidrólisis obtenidos para esta enzima son similares a lo reportado por Arévalo-Villena et al., que observaron un 59% y 63% de hidrólisis los glicósidos totales de vinos de variedades aromáticas y neutras, usando un extracto de levadura con actividad BGL (Arévalo-Villena, Úbeda-Iranzo & Briones-Pérez, 2007). En otro estudio, Goldner et al. consiguieron alrededor del 35% de hidrólisis en vino de Tannat en un tratamiento de 12 días usando enzimas comerciales en solución (Cid et al., 2012). En este trabajo, el porcentaje de hidrólisis en esta variedad fue superior ( $73\pm 3\%$ ) empleando la enzima BGL *I. terricola* estabilizada mediante inmovilización, en un tratamiento de 20 días.

### *En Vino Moscatel blanco*

Los resultados del tratamiento de vino Moscatel joven (ajustado a pH 4.0) con las BGLs de cepas nativas se muestran en la (Tabla 4.11).

**Tabla 4.11** Agliconas identificadas y cuantificadas (mediante GC-MS), para control y tratamientos de vino Moscatel.

	Compuesto	Vino control ( $\mu\text{g/L}$ )	BGL <i>I. terricola</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	BGL <i>I. orientalis</i> ( $\mu\text{g/L}$ )
Ácidos alifáticos	ácido isobutírico	104 $\pm$ 9	106 $\pm$ 5	102 $\pm$ 8
	ácido isovalérico	136 $\pm$ 10	148 $\pm$ 16	109 $\pm$ 15
	<b>Total ácidos alifáticos</b>	<b>240 <math>\pm</math> 19</b>	<b>254 <math>\pm</math> 21</b>	<b>211 <math>\pm</math> 23</b>
Alcoholes alifáticos	álcohol isobutílico	1771 $\pm$ 180	2330 $\pm$ 300	2261 $\pm$ 136
	1-butanol	177 $\pm$ 20	209 $\pm$ 12	200 $\pm$ 11
	álcohol isoamílico	68375 $\pm$ 5500	74456 $\pm$ 3556	66384 $\pm$ 4122
	<b>Total alcoholes alifáticos</b>	<b>70323 <math>\pm</math> 5700</b>	<b>96402 <math>\pm</math> 3868</b>	<b>68845 <math>\pm</math> 4269</b>
Bencénicos	álcohol bencílico	42 $\pm$ 3	36 $\pm$ 3	36 $\pm$ 2
	2-feniletanol	18949 $\pm$ 2125	16094 $\pm$ 2051	16084 $\pm$ 2133
	<b>Total bencénicos</b>	<b>18991 <math>\pm</math> 2128</b>	<b>16130 <math>\pm</math> 2054</b>	<b>16156 <math>\pm</math> 2135</b>
Fenoles	metil-2,6-dihidroxibenzoato	39 $\pm$ 4	44 $\pm$ 4	39 $\pm$ 2
	4-vinilguaiaacol	95 $\pm$ 4 a	135 $\pm$ 9 b	114 $\pm$ 8 a
	metil salicilato	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	4-hidroxi-3-metoxifeniletal alcohol	22 $\pm$ 2 a	35 $\pm$ 3 b	22 $\pm$ 3 a
	3,4,5-trimetoxifenol	12 $\pm$ 1 a	20 $\pm$ 2 b	12 $\pm$ 1 a
	<b>Total fenoles</b>	<b>169 <math>\pm</math> 11 a</b>	<b>235 <math>\pm</math> 18 b</b>	<b>188 <math>\pm</math> 14 a</b>
Norisoprenoides	3-oxo- $\alpha$ -ionol	15 $\pm$ 1 a	35 $\pm$ 3 b	13 $\pm$ 2 a
	3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol	2 $\pm$ 1 a	6 $\pm$ 1 b	1 $\pm$ 0 a
	vomifoliol	12 $\pm$ 2 a	22 $\pm$ 3 b	13 $\pm$ 2 a
	<b>Total norisoprenoides</b>	<b>29 <math>\pm</math> 4 a</b>	<b>63 <math>\pm</math> 7 b</b>	<b>27 <math>\pm</math> 4 a</b>
Terpenos	óxido de trans-furan linalool	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 0	3 $\pm$ 1
	óxido de cis-furan linalool	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
	linalool	34 $\pm$ 4	34 $\pm$ 5	32 $\pm$ 3
	$\alpha$ -terpineol	15 $\pm$ 6	9 $\pm$ 3	13 $\pm$ 4
	ho-diol (I)	566 $\pm$ 31	530 $\pm$ 43	507 $\pm$ 49
	trans-8-hidroxilinalool	30 $\pm$ 3	41 $\pm$ 6	33 $\pm$ 2
	cis-8-hidroxilinalool	52 $\pm$ 5 a	125 $\pm$ 9 b	58 $\pm$ 5 a
	<b>Total terpenos</b>	<b>701 <math>\pm</math> 50</b>	<b>741 <math>\pm</math> 66</b>	<b>647 <math>\pm</math> 63</b>

a, b y c indican las diferencias significativas mediante ANOVA

El tratamiento con BGL *I. terricola* mostró un incremento significativo y notorio de los norisoprenoides totales (de  $29 \pm 4$  a  $63 \pm 7 \mu\text{g/L}$ ) y el compuesto terpénico cis-8-hidroxilinalool (de  $52 \pm 5$  a  $125 \pm 9 \mu\text{g/L}$ ). En cambio, el incremento de fenoles totales fue significativo pero de menor magnitud (de  $169 \pm 11$  a  $235 \pm 18 \mu\text{g/L}$ ). En cuanto a la BGL *I. orientalis*, no se observaron diferencias significativas para norisoprenoides y terpenos ( $27 \pm 4$  y  $647 \pm 63 \mu\text{g/L}$ , respectivamente) con respecto al control ( $29 \pm 4$  y  $701 \pm 50 \mu\text{g/L}$ ). En todos los casos, no se observaron diferencias significativas en la concentración de ácidos y alcoholes alifáticos y bencénicos, sugiriendo que la actividad de estas BGLs no es preponderante ante los precursores de las agliconas identificadas para estos compuestos.

Debe destacarse que a pesar que el tratamiento con BGL *I. orientalis* mostró un 45% de hidrólisis de glicósidos totales (G-G), no se observó incremento de

agliconas aromáticas en vino Moscatel (Tabla 4.11). Este resultado sugiere la posible hidrólisis de glicósidos no asociados a aromas, como podrían ser los flavonoides, de hecho Moscatel se caracteriza por un elevado contenido de estos compuestos (Serrano de la Hoz, 2014). Adicionalmente, llama la atención el hecho que la enzima fuera poco estable en esta matriz, encontrándose completamente inactiva al final del proceso.

### *En vino Tannat*

Vista la relevancia de los vinos de ésta variedad en la industria vitivinícola de nuestro país, se estudió el impacto en la liberación de volátiles por BGLs *I. terricola* e *I. orientalis* y en comparación con una preparación comercial comúnmente utilizada (glicosidasas de *A. niger*) las cuales también se utilizaron de forma inmovilizadas (González-Pombo et al., 2014).

**Tabla 4.12** Agliconas identificadas y cuantificadas (mediante GC-MS) para control y tratamientos de vino Tannat con BGLs de levaduras nativas y preparación comercial *A. niger*.

	Compuesto	Control (µg/L)	BGL <i>I. terricola</i> (µg/L)	BGL <i>I. orientalis</i> (µg/L)	Glicosidasas <i>A. niger</i> (µg/L)
Ácidos alifáticos	ácido octanoico	2067 ± 117	1913 ± 120	1852 ± 210	1947 ± 60
	ácido isobutírico	842 ± 39	1010 ± 113	767 ± 51	729 ± 75
	ácido isovalérico	577 ± 29	491 ± 57	579 ± 33	614 ± 35
	<b>Total ácidos alifáticos</b>	<b>3486 ± 185</b>	<b>3414 ± 290</b>	<b>3198 ± 294</b>	<b>3290 ± 170</b>
Alcoholes alifáticos	alcohol isobutílico	8434 ± 211	7818 ± 412	9906 ± 315	9139 ± 723
	1-butanol	433 ± 21	404 ± 31	464 ± 17	466 ± 29
	<b>Total alcoholes alifáticos</b>	<b>8867 ± 232</b>	<b>8222 ± 443</b>	<b>10370 ± 332</b>	<b>9605 ± 752</b>
Bencénicos	2-fenietanol	29160 ± 1233	28689 ± 1119	30391 ± 1001	31711 ± 2226
	alcohol bencílico	554 ± 40	555 ± 23	503 ± 51	599 ± 31
	<b>Total bencénicos</b>	<b>29714 ± 1273</b>	<b>29244 ± 1142</b>	<b>30894 ± 1052</b>	<b>32310 ± 2257</b>
C6	1-hexanol	1171 ± 101	1013 ± 56	1202 ± 58	1254 ± 121
	cis-3-hexen-1-ol	44 ± 3	48 ± 4	46 ± 3	41 ± 4
	trans-3-hexen-1-ol	89 ± 5	89 ± 6	93 ± 7	97 ± 7
	<b>Total C6</b>	<b>1304 ± 109</b>	<b>1150 ± 66</b>	<b>1341 ± 68</b>	<b>1392 ± 132</b>
Fenoles	guaiacol	239 ± 28 a	317 ± 17 b	245 ± 21 a	260 ± 33 a
	4-etilfenol	125 ± 13	110 ± 9	129 ± 10	126 ± 6
	4-vinilguaiacol	96 ± 6 a	149 ± 10 b	105 ± 9 a	140 ± 9 b
	2,6-dimetoxifenol	274 ± 10	288 ± 14	253 ± 19	324 ± 29
	<b>Total fenoles</b>	<b>734 ± 57</b>	<b>864 ± 50</b>	<b>732 ± 59</b>	<b>850 ± 77</b>
Norisoprenoides	3-oxo-α-ionol	11 ± 1 a	68 ± 5 c	7 ± 1 a	44 ± 2 b
	vomifoliol	16 ± 3 a	57 ± 3 b	21 ± 3 a	49 ± 3 b
	3-oxo-7,8-dihidro-α-ionol	21 ± 8 a	97 ± 15 c	18 ± 7 a	45 ± 2 b
	dehidrovomifoliol	108 ± 5 a	138 ± 20 c	115 ± 8 a	120 ± 4 b
	<b>Total norisoprenoides</b>	<b>156 ± 17 a</b>	<b>360 ± 43 c</b>	<b>161 ± 19 a</b>	<b>258 ± 11 b</b>
Terpenos	ho-diol	30 ± 3	41 ± 3	29 ± 3	34 ± 2
	α-terpineol	16 ± 1	16 ± 1	15 ± 1	17 ± 1
	geraniol	6 ± 1 a	14 ± 2 c	10 ± 3 a	9 ± 1 b
	<b>Total terpenos</b>	<b>52 ± 5 a</b>	<b>71 ± 5 b</b>	<b>54 ± 7 a</b>	<b>60 ± 4 a</b>

a, b y c indican las diferencias significativas mediante ANOVA

Los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos enzimáticos del vino Tannat, muestran que no se observaron cambios en la concentración de las agliconas de ácidos y alcoholes alifáticos, compuestos bencénicos y C6 (Tabla

4.12). Con respecto a los fenoles, las BGL *I. terricola* y glicosidasas de *A. niger* incrementaron significativamente la concentración de 4-vinilguaiacol, de  $96 \pm 6$  a  $149 \pm 10$  y  $140 \pm 9$   $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. Adicionalmente, se observó una alta especificidad de BGL *I. terricola* frente a la hidrólisis de precursores de guaiacol y fue la única enzima que incrementó significativamente su concentración respecto al control: de  $239 \pm 28$  a  $317 \pm 17$   $\mu\text{g/L}$ . En cuanto a los terpenos, la BGL *I. terricola* se destaca por duplicar la concentración de geraniol libre ( $14 \pm 2$   $\mu\text{g/L}$ ), con respecto al control ( $6 \pm 1$   $\mu\text{g/L}$ ). Las glicosidasas de *A. niger* también fueron activas frente a precursores de geraniol pero la concentración alcanzada fue menor ( $9 \pm 1$   $\mu\text{g/L}$ ). En cuanto a los norisoprenoides, la BGL *I. terricola* y las glicosidasas de *A. niger* mostraron especificidad para todos los precursores de las agliconas identificadas, incrementando los totales de  $156 \pm 17$   $\mu\text{g/L}$  a  $360 \pm 43$  y  $258 \pm 11$   $\mu\text{g/L}$ , respectivamente. La BGL *I. orientalis*, una vez más, si bien hidrolizó los glicósidos totales en un  $32 \pm 3$  % (G-G), no se observó actividad frente a precursores de aromas en vino Tannat y tal y como ocurrió en vino Moscatel, la enzima no fue estable en esta matriz.

De estos resultados se destaca notablemente la BGL *I. terricola* en comparación con la BGL *I. orientalis* y las glicosidasas de *A. niger*. Para la mayoría de las agliconas en donde hubo diferencias significativas (guaiacol, 3-oxo- $\alpha$ -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol, dehidrovomifoliol y geraniol), las concentraciones alcanzadas por BGL *I. terricola* fueron significativamente superiores en comparación con el extracto comercial. En función de estos resultados prometedores obtenidos con BGL *I. terricola* se evaluó la performance de esta enzima en otra variedad tinta: vino Cabernet sauvignon.



### *En vino Cabernet sauvignon*

En la **Tabla 4.13** se muestran los resultados obtenidos del tratamiento de vino tinto Cabernet sauvignon.

**Tabla 4.13** Agliconas identificadas y cuantificadas (mediante GC-MS) para control y tratamiento de vino Cabernet sauvignon joven con BGL de *I. terricola*.

	Compuesto ( $\mu\text{g/L}$ )	Control ( $\mu\text{g/L}$ )	BGL <i>I. terricola</i> ( $\mu\text{g/L}$ )	Umbral de percepción ( $\mu\text{g/L}$ )	Descriptor aromático
Ácidos alifáticos	Ácido isovalérico	685 $\pm$ 3	725 $\pm$ 27	33	sudor, rancio graso, queso
	Ácido octanoico	990 $\pm$ 37	930 $\pm$ 236	500	
	<b>Total ácidos alifáticos</b>	<b>1675 <math>\pm</math> 40</b>	<b>1665 <math>\pm</math> 263</b>		
Alcoholes alifáticos	Alcohol isobutílico	3704 $\pm$ 222	3684 $\pm$ 233	40.000	fuel
	1-butanol	138 $\pm$ 15	195 $\pm$ 26	150.000	medicinal
	<b>Total alcoholes alifáticos</b>	<b>3842 <math>\pm</math> 237</b>	<b>3879 <math>\pm</math> 259</b>		
Bencénicos	2-feniletanol	19988 $\pm$ 885	25852 $\pm$ 5200	N.D.	N.D.
	alcohol bencílico	122 $\pm$ 12	145 $\pm$ 24	200.000	floral, rosas, balsámico
	<b>Total bencénicos</b>	<b>20110 <math>\pm</math> 897</b>	<b>25997 <math>\pm</math> 5224</b>		
C6	1-hexanol	742 $\pm$ 16	781 $\pm$ 14	2500	pasto recién cortado
	Cis-3-hexen-1-ol	68 $\pm$ 2 a	89 $\pm$ 3 b	400	hierbas, kiwi
	<b>Total C6</b>	<b>810 <math>\pm</math> 18</b>	<b>870 <math>\pm</math> 17</b>		
Norisoprenoides	vomifoliol	9 $\pm$ 1 a	15 $\pm$ 1 b	N.D.	N.D.
	3-oxo- $\alpha$ -ionol	8 $\pm$ 1 a	13 $\pm$ 1 b	N.D.	miel, nueces
	<b>Total norisoprenoides</b>	<b>17 <math>\pm</math> 2 a</b>	<b>28 <math>\pm</math> 2 b</b>		
Fenoles	2,6-dimethoxifenol	595 $\pm$ 82 a	1039 $\pm$ 189 b	570	nueces, ahumado
	guaiacol	15 $\pm$ 6 a	71 $\pm$ 1 b	75	ahumado
	<b>Total fenoles</b>	<b>610 <math>\pm</math> 88 a</b>	<b>1110 <math>\pm</math> 190 b</b>		

a, b y c indican las diferencias significativas mediante ANOVA

Después del tratamiento enzimático del vino, las formas libres de ácidos y alcoholes alifáticos y bencénicos permanecieron sin cambios, con respecto al vino control (**Tabla 4.13**). En cuanto a los fenoles, se observó incremento significativo y muy relevante en los totales de  $610 \pm 88 \mu\text{g/L}$  a  $1110 \pm 190 \mu\text{g/L}$  debido principalmente a una elevada actividad de la enzima sobre de 2,6 dimetoxifenol. Por primera vez, la concentración de compuestos de C6 particularmente cis-3-hexen-1-ol, se incrementó significativamente (de  $68 \pm 2$  a  $89 \pm 3 \mu\text{g/L}$ ), lo que podría deberse a una mayor disponibilidad de precursores de este compuesto en esta variedad. Una vez más la enzima mostró elevada actividad sobre norisoprenoides, incrementando significativamente las concentraciones de vomifoliol (de  $9 \pm 1$  a  $15 \pm 1 \mu\text{g/L}$ ) y 3-oxo- $\alpha$ -ionol (de  $8 \pm 1$  a  $13 \pm 1 \mu\text{g/L}$ ).

### *En glucósidos de antocianinas*

Los glucósidos de antocianinas son los pigmentos responsables del color en vinos tintos y debido a que estos compuestos se encuentran como monoglucósidos, por lo que estudiar la actividad de las BGLs es fundamental ya que la hidrólisis de estos podría conllevar a la pérdida de color del producto (Barbagallo et al., 2007; Corduas, Cinquanta, & Ievoli, 2013). En ese sentido, se determinó la concentración de antocianinas en los tratamientos de los vinos tintos, con BGL *I. terricola* (Tabla 4.14).

**Tabla 4.14** Concentración de glucósidos de antocianinas de vinos tintos tratados con BGL *I. terricola*.

	Antocianinas (mg/L)	
	Tannat	C. sauvignon
<b>Control</b>	352 ± 23 b	210 ± 22
<b>Tratamiento</b>	200 ± 18 a	188 ± 20

En la variedad Cabernet sauvignon, se observó que la BGL *I. terricola* no fue activa, ya que la concentración de antocianinas no presentó diferencias significativas frente al control (210±22 mg/L vs. 188±20 mg/L). En cambio, en el tratamiento de vino Tannat se observó una disminución significativa con respecto al control (de 352±23 a 200±18 mg/L). La composición de antocianinas en esta variedad está compuesta principalmente por malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-acetilglucósido (Wang et al., 2013) mientras que los vinos Tannat contienen mayoritariamente delphinidina, petunidina y glucósidos no acilados (Gonz, 2016; Wang et al., 2013). El hecho de que la BGL *I. terricola* no hidrolizó antocianinas en Cabernet sauvignon pero si fue activa en Tannat, podría atribuirse a la especificidad de la enzima hacia las antocianinas de esta variedad. Por lo tanto, para la aplicación de esta enzima en vinos tintos sin comprometer el color, es importante tener en cuenta la variedad.

## Valores de Actividad Odorante (VAOs) determinados en los tratamientos de vinos tintos

Considerando las diferencias significativas en las concentraciones de algunos compuestos volátiles liberados luego del tratamiento enzimático, es de gran interés estudiar el impacto producido directamente sobre el aroma del vino. Los compuestos detectados mediante espectrometría de masas no necesariamente son detectados por el sentido del olfato humano, ya que se debe considerar el umbral de cada compuesto, y el hecho de que el aroma del vino es la suma de la contribución de todos los compuestos aromáticos volátiles presentes (Styger, Prior, & Bauer, 2011).

**Tabla 4.15** Valores de actividad odorante (VAO) de aquellos compuestos de vino Tannat para los cuales se observaron diferencias significativas en los tratamientos enzimáticos.

	Aglicona (valor umbral de percepción en $\mu\text{g/L}$ )	Descriptor	Control	VAO	
				BGL <i>I. terricola</i>	Glicosidasas <i>A. niger</i>
Fenoles	Guaiacol (9.5)	Ahumado	25	33	27
	4-vinilguaiacol (40)	Curry, clavo de olor	2	4	4
	3-Oxo- $\alpha$ -ionol ( $\leq 10$ )	Miel, damasco	1	7	4
Norisoprenoides	Vomifoliol ( $\leq 10$ )	Frutos secos, Nueces	2	6	5
	3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol ( $\leq 10$ )	N.D.	2	10	5
	Dehidrovomifoliol ( $\leq 10$ )	N.D.	11	14	12
Terpenos	Geraniol (130)	Dulce, floral, frutal, rosas, cítrico	0,05	0,11	0,07

En el tratamiento de vino Tannat, el VAO alcanzado para guaiacol es alto en todos los casos (Tabla 4.15), tanto control como tratamientos, debido a que este compuesto presenta un umbral de percepción muy bajo ( $9.5 \mu\text{g/L}$ ) y a que su concentración estaba muy por encima de este valor incluso en el control ( $239 \pm 28 \mu\text{g/L}$ ). En el caso del 4-vinilguaiacol el VAO fue igual para los distintos tratamientos enzimáticos (VAO=4) y el doble en comparación al control (VAO=2). En cuanto a los norisoprenoides, los valores de umbrales de percepción no se han cuantificado, sin embargo, se sabe que en general su impacto en el aroma se da cuando la concentración es  $2-10 \mu\text{g/L}$  (Sacks et al., 2012; Sefton et al., 2011). Teniendo en cuenta esos valores se estimaron VAOs (considerando un umbral de  $10 \mu\text{g/L}$ ). De los resultados puede apreciarse que en todos los casos, los VAOs alcanzados en el tratamiento con BGL *I. terricola* son superiores al control y al tratamiento con glicosidasas de *A. niger*. Los compuestos

que se destacaron en el tratamiento con BGL *I. terricola* fueron 3-oxo- $\alpha$ -ionol (VAO=7) y 3-oxo-7,8-dihidro- $\alpha$ -ionol (VAO=10) en comparación al control (VAO 1 y 2, respectivamente) y al tratamiento con glicosidasas de *A. niger* (VAO 4 y 5, respectivamente). Aunque los niveles de geraniol están por debajo de su valor umbral, una vez más se destaca la BGL *I. terricola* con un VAO de 0.11, el doble si se compara con el control (VAO=0.05) y mayor que lo obtenido por glicosidasas de *A. niger* (VAO=0.07).

En la **Tabla 4.16** se muestran los VAOs para el tratamiento de vino Cabernet sauvignon con BGL *I. terricola*.

**Tabla 4.16** Valores de actividad odorante (VAO) de aquellos compuestos de vino C. sauvignon para los cuales se observaron diferencias significativas en el tratamiento con BGL *I. terricola*.

	Aglicona (umbral de percepción en $\mu\text{g/L}$ )	Descriptor	VAO	
			Control	BGL <i>I. terricola</i>
C6	Cis-3-hexen-1-ol (400)	Hierbas, kiwi	0.2	0.2
Fenoles	2,6-dimetoxifenol (570)	Nueces, ahumado	1	2
	Guaiacol (9.5)	Ahumado	2	8
Norisoprenoides	3-Oxo- $\alpha$ -ionol ( $\leq 10$ )	Miel, damasco	0.8	1.3
	Vomifoliol ( $\leq 10$ )	Frutos secos, nueces	0.9	1.5

Si bien la concentración de cis-3-hexen-1-ol se incrementó significativamente en el tratamiento de Cabernet sauvignon (**Tabla 4.13**), no se observaron diferencias en los VAOs de control y tratamiento (**Tabla 4.16**). En el caso de los fenoles 2,6-dimetoxifenol y guaiacol, estos valores fueron 2 y 4 veces superior, respectivamente, en comparación al control. De la misma manera, los VAOs de los norisoprenoides 3-oxo- $\alpha$ -ionol y vomifoliol del tratamiento enzimático (1.3 y 1.5, respectivamente) fueron superiores al control (VAOs 0.8 y 0.9, respectivamente). Se destaca que el tratamiento con BGL *I. terricola* permitió incrementar la concentración de norisoprenoides a concentraciones perceptibles por el olfato (VAOs superiores a 1).

Aunque el umbral y el VAO se usan comúnmente para describir la percepción de un compuesto particular en el aroma, estos valores deben usarse con precaución para describir mezclas complejas tales como vinos. En estos casos, pueden producirse efectos en la percepción de aromas tanto sinérgicos como

antagónicos. En la primera situación, diferentes compuestos podrían ser percibidos incluso si todos los componentes se encuentran a concentraciones por debajo de sus umbrales. El efecto antagónico por el contrario, se da cuando los compuestos enmascaran la percepción de otros, pudiendo permanecer sin detectarse incluso en concentraciones superiores al umbral (Ilc, Werck-Reichhart, & Navrot, 2016). Por lo tanto, el VAO es un valor teórico sobre la posible percepción de un compuesto, pero no es del todo concluyente. Los estudios sensoriales en cambio, permiten definir la contribución real de los tratamientos en el aroma de vinos.

### Evaluación sensorial de los tratamientos de vinos tintos

En vino Tannat, los resultados del test triangular evidenciaron que existen diferencias altamente significativas entre el aroma de los vinos tratados con BGL *I. terricola* y glicosidasas *A. niger* en comparación al control (Tabla 4.17).

**Tabla 4.17** Resultados de test sensorial (triangular) para el tratamiento de vino Tannat con enzimas BGL *I. terricola* y BGL *A. niger*

Tratamiento	Nro. juicios totales	Nro. juicios correctos	Nivel de significancia	Descriptor aromáticos
BGL <i>I. terricola</i>	21	15	$p \leq 0.001$	Frutos secos, pasas
Glicosidasas <i>A. niger</i>	21	15	$p \leq 0.001$	Más dulce, floral

En el tratamiento con glicosidasas *A. niger* las notas encontradas por los evaluadores fueron más dulces y florales. En el caso de BGL *I. terricola*, se destacaron notas de frutos secos y pasas lo que podría explicarse por la alta actividad de esta enzima hacia los precursores de norisoprenoides. Las formas libres de estos compuestos han sido caracterizadas como potenciadoras de este tipo de notas (Escudero, Campo, Fariña, Cacho, & Ferreira, 2007; Wang, Kang, Xu, Li, & Brew, 2011). Cuando se les pidió a los participantes que eligieran entre uno de los dos tratamientos enzimáticos del vino tinto, 90% eligieron el de BGL *I. terricola*, lo que resalta el valor de esta enzima como potencial para su uso en vinos tintos por la complejidad aromática alcanzada. Similarmente, luego del tratamiento de C. sauvignon (Tabla 4.18), el panel de jueces consideró que el vino tratado con BGL *I. terricola* contenía notas de frutas secas y pasas, lo que

está en concordancia nuevamente con el incremento en la concentración de norisoprenoides.

**Tabla 4.18** Resultados de test sensorial (triangular) para el tratamiento de vino C. sauvignon con BGL *I. terricola*

Triángulo	Nro. juicios totales	Nro. juicios correctos	Nivel de significancia	Descriptorios aromáticos
BGL <i>I. terricola</i> vs. control	28	21	$p \leq 0.001$	Pasas, frutos secos, nueces

Por lo tanto, los resultados del estudio sensorial se correlacionaron perfectamente con los de espectrometría de masas, en los tratamientos con BGL *I. terricola*. Cabe destacar que el aumento de los compuestos norisoprenoides ocurre lentamente durante el envejecimiento del vino (Loscos et al., 2010) proceso que demora hasta 6 meses en barrica (Oberholster et al., 2015). Sin embargo, el uso de BGL *I. terricola* permite alcanzar dichas notas en muy poco tiempo (20 días y permite además una liberación controlada de estos aromas ya que bajo la forma inmovilizada uno puede controlar el avance de la reacción de hidrólisis.

### **Evaluación del posible reuso de los biocatalizadores inmovilizados**

Cómo se mencionó anteriormente, una de las grandes ventajas que presenta el uso de enzimas inmovilizadas es la posibilidad de reusar el biocatalizador. Luego de 20 días, la actividad remanente de la BGL *I. terricola* en la variedad blanca Moscatel fue de  $91 \pm 3$  % y en las tintas se retuvo  $75 \pm 3$  % en C. sauvignon y  $80 \pm 2$  % en Tannat. El hecho de que haya sido algo menos estable en estos últimos, en comparación con la variedad blanca, podría deberse a que los vinos tintos y rosados poseen mayor contenido polifenólico (ej. antocianidinas) que pueden interactuar con proteínas alterando incluso su estructura secundaria (Di Gaspero et al., 2020; Paixão, Perestrelo, Marques, & Câmara, 2007). En cuanto a la BGL *I. orientalis* tal y como mencionó anteriormente, la enzima estaba completamente inactiva al final de los tratamientos, lo que en parte explica que no se haya observado actividad en los vinos.

En resumen, BGL *I. terricola* fue activa en los diferentes vinos ensayados (Moscatel, Tannat y C. sauvignon) mostrando preferencia mayoritariamente sobre precursores de norisoprenoides y sobre algunos terpenos y fenoles volátiles. Los resultados de espectrometría de masas se correlacionaron perfectamente con las notas detectadas por el Panel de Evaluación Sensorial dónde se destacaron las asociadas a norisoprenoides (frutos secos, etc.). La enzima fue activa frente a glucósidos de antocianinas de vino Tannat pero no en Cabernet sauvignon. La elevada estabilidad de la enzima se evidenció al final de los procesos donde retuvo hasta el 91% de su actividad por lo que podría reusarse para tratamientos aromáticos posteriores. Los resultados obtenidos en esta Sección despertaron el interés en continuar explorando alternativas biotecnológicas que posibiliten para la el potencial uso de la BGL *I. terricola* en vinificación.

#### **4.4 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BGL I. TERRICOLA**

##### **La composición del medio nutriente es clave para la inducción de actividad BGL**

Las aplicaciones tecnológicas de las BGLs implican una alta demanda para su producción a partir de fuentes microbianas en condiciones industriales rentables. Debido a que en general, los microorganismos producen estas enzimas en bajas concentraciones, la optimización de las condiciones de cultivo es crucial en la producción y comercialización de las mismas (Ahmed, Nasim, et al., 2017). Entre otras celulasas, las BGLs son inducibles en respuesta a diversas fuentes de carbono las que pueden ser complejas como celulosa, salvado de trigo, cáscara de arroz, bagazo de caña de azúcar y pectina, o simples como glucosa, lactosa, celobiosa o soforosa. Los carbohidratos complejos no pueden ingresar a las células a través de la membrana celular, por lo que las celulasas, expresadas de manera constitutiva, degradan a carbohidratos más simples como celobiosa, lactosa, etc., que sí pueden ingresar a las células a través de transportadores específicos, induciendo la expresión de BGLs (Ahmed, Nasim, et al., 2017; Karaffa et al., 2006; Zhou et al., 2012). Las fuentes de nitrógeno de los cultivos pueden ser orgánicas (ej. peptona, extracto de levadura, triptona, entre otras) o inorgánicas (generalmente sales de amonio). Los diferentes microorganismos responden de manera distinta a las fuentes de nitrógeno y la influencia de éstas en la expresión de BGLs no es clara (Ahmed, Nasim, et al., 2017). En cuanto a parámetros fisicoquímicos como temperatura y pH, se ha observado que la producción de BGLs microbianas es máxima en la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo y poco se sabe sobre la incidencia del pH (Ahmed, Nasim, et al., 2017; Jeya et al., 2010; Park et al., 2012). Otros factores como el tamaño del inóculo inicial, agregado de aditivos, aireación, concentración de sales y sustratos también pueden afectar la producción de estas enzimas.



## Los cultivos *batch* alimentado permiten controlar la velocidad específica de crecimiento y la cantidad de producto

Existen tres modos principales de operación de reactores de cultivo: discontinuo (*batch*), semi-continuo (*batch* alimentado) y continuo (Martos, 2011). Estos sistemas permiten regular condiciones tales como mezclado, termostatación, suministro de oxígeno, entradas para adición de nutrientes, control de pH, etc. Un proceso discontinuo (*batch*) ocurre en un sistema cerrado en el cual, toda la materia se añade al sistema al inicio y los productos se recogen únicamente cuando el proceso ha finalizado. El cultivo en *batch* es el método más simple, en el que el microorganismo crece hasta que se agota un nutriente esencial (sustrato limitante) o se acumulan subproductos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento (Martos, 2011; Obom, Magno, & Cummings, 2013). El cultivo semi-continuo, permite la entrada o salida de masa, pero no ambas, mientras que el continuo, permite entrada y salida, y si las velocidades son iguales, el proceso puede operar indefinidamente. Los cultivos *batch* son simples y robustos, pero como desventaja, los microorganismos crecen a una velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu$ ) durante buena parte del cultivo, lo que limita la cantidad de oxígeno disponible. Algunos organismos cuando crecen a velocidades específicas elevadas poseen un metabolismo respiro-fermentativo en el cual en condiciones aerobias producen etanol en lugar de biomasa (efecto Crabtree). Esto plantea una limitante si el producto deseado está asociado al crecimiento (Alfenore et al., 2004). Una alternativa es emplear un sistema de *batch* alimentado, en el cual el sustrato (ej. glucosa), o un componente que tenga un efecto crítico en el control de la fermentación, se va suministrando para controlar la velocidad de crecimiento. Esto permite que las células crezcan a una alta densidad (biomasa) con metabolismo respiratorio, manteniendo una velocidad específica de crecimiento baja (Hernández-Díaz, & Vargas-García, 2016). Adicionalmente, se eliminan los efectos represores por exceso de sustrato y posibles efectos tóxicos derivados del exceso de metabolitos generados (ej. etanol). El *batch* alimentado es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de productos son sensibles a la concentración del sustrato limitante,

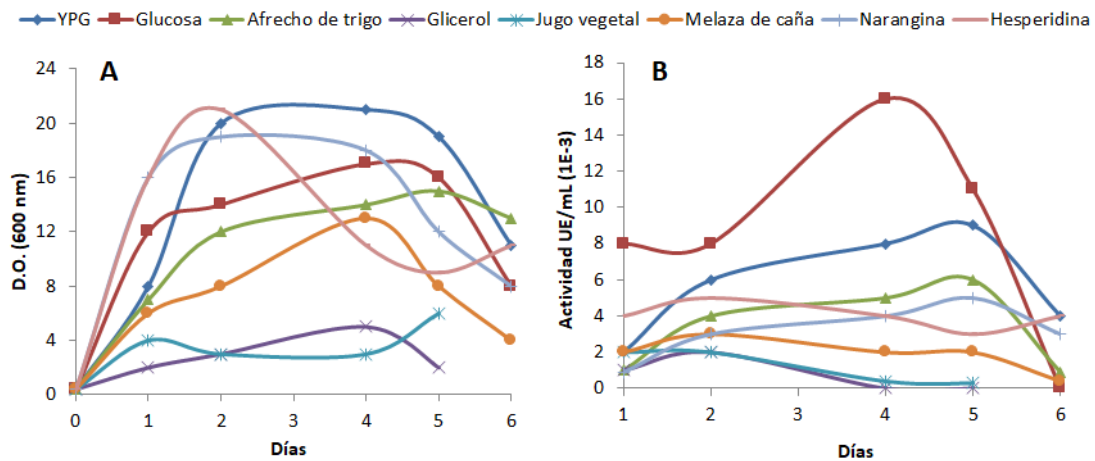
optimizando así la obtención de productos asociados al crecimiento (Hewitt & Nienow, 2007; Martos, 2011)

A continuación se muestran los resultados de optimización de la producción de BGL *I. terricola* inicialmente, en *batch* Erlenmeyer, variando la composición de los medios nutrientes y condiciones de pH inicial y temperatura de cultivo. El proceso se escaló a biorreactores, en cultivos *batch* y *batch* alimentado. Estos ensayos se realizaron en el curso de una pasantía realizada en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales de La Plata (CINDEFI), Argentina, bajo la supervisión del Dr. Sebastián Cavalitto y la Dra. Ivana Cavello.

## Efecto de medios nutrientes en el crecimiento y la cinética de producción de BGL

En los cultivos de *I. terricola* 0621 de rutina en medio YPG, la actividad en el sobrenadante precipitado era de 1.2 UE totales, suficiente para el tratamiento de apenas 1L de vino. Por esta razón, resulta indispensable mejorar sustancialmente la producción de esta enzima.

En primer lugar, se evaluó el efecto sobre el crecimiento (**Figura 4.11 A**) y la actividad BGL (**Figura 4.11 B**) para diferentes medios sintéticos y semisintéticos, que varían principalmente en las fuentes de carbono. Como referencia, se empleó el medio nutriente YPG utilizado de rutina. Como se puede observar en la **Figura 4.11 A**, *I. terricola* creció en la mayoría de los medios empleados, a partir las siguientes fuentes de carbono ofrecidas: glucosa, narangina, hesperidina, melaza de caña y en menor medida, glicerol y jugo vegetal.



**Figura 4.11** Curva de crecimiento (A) y producción de actividad BGL (B) de *I. terricola* 0621 en cultivos *batch* en Erlenmeyer, con agitación 18 rpm y T=28°C en diferentes medios. El desvío estándar (DS) en ningún caso superó el 10%.

El medio de referencia YPG y los medios sintéticos con hesperidina, narangina y glucosa fueron las condiciones mejores para la producción de biomasa con máximos de Abs 600 nm de 16-21. Si bien se han reportado algunas levaduras no-*Saccharomyces* que consumen los azúcares fermentables glucosa y fructosa a la misma velocidad, la mayoría son glucofílicas por lo que la glucosa es la fuente

de carbono de preferencia para el crecimiento de estos organismos (Viana, Gil, Genovés, Vallés, & Manzanares, 2008). La narangina y la hesperidina son flavonoides glicosilados los que, para ser utilizados deben ser hidrolizados por otras enzimas a sus unidades constitutivas (monómeros de glucosa). Su inclusión como única fuente de carbono se propuso para evaluar si pueden inducir la expresión de glicosidasas. En el medio conteniendo melaza de caña como fuente de carbono, el máximo crecimiento alcanzado ( $Abs\ 600\ nm=12$ ) fue menor a lo alcanzado para el medio conteniendo glucosa como única fuente de C ( $Abs\ 600\ nm=16$ ). La composición de la melaza es de aproximadamente 26-40% de sacarosa y de 12-25% de otros azúcares reductores. Visto que la concentración de la fuente de carbono en ambos medios era la misma (10 g/L) este resultado sugiere que la levadura crece mejor en un medio con glucosa como única fuente de carbono que con una mezcla de azúcares.

Mientras que en el medio de referencia YPG (conteniendo 10 g/L de glicerol) el crecimiento fue óptimo ( $Abs\ 600\ nm= 20$ ), en el medio sintético con 10 g/L de glicerol como única fuente de carbono creció muy poco ( $Abs\ 600\ nm=4$ ). Esto concuerda con antecedentes en los que se ha reportado que la utilización de glicerol como fuente de carbono por estos organismos es variable y dependiente de la fuente de nitrógeno utilizada. Para una misma especie se han observado diferencias en las tasas de utilización de glicerol, desde valores comparables al consumo de glucosa hasta una incapacidad casi completa para usar este compuesto como única fuente de carbono, y esto último ocurre especialmente en medios sin aminoácidos u otros complementos nutricionales (Klein, Swinnen, Thevelein, & Nevoigt, 2017; Kurtzman, Fell, Boekhout, & Robert, 2011).

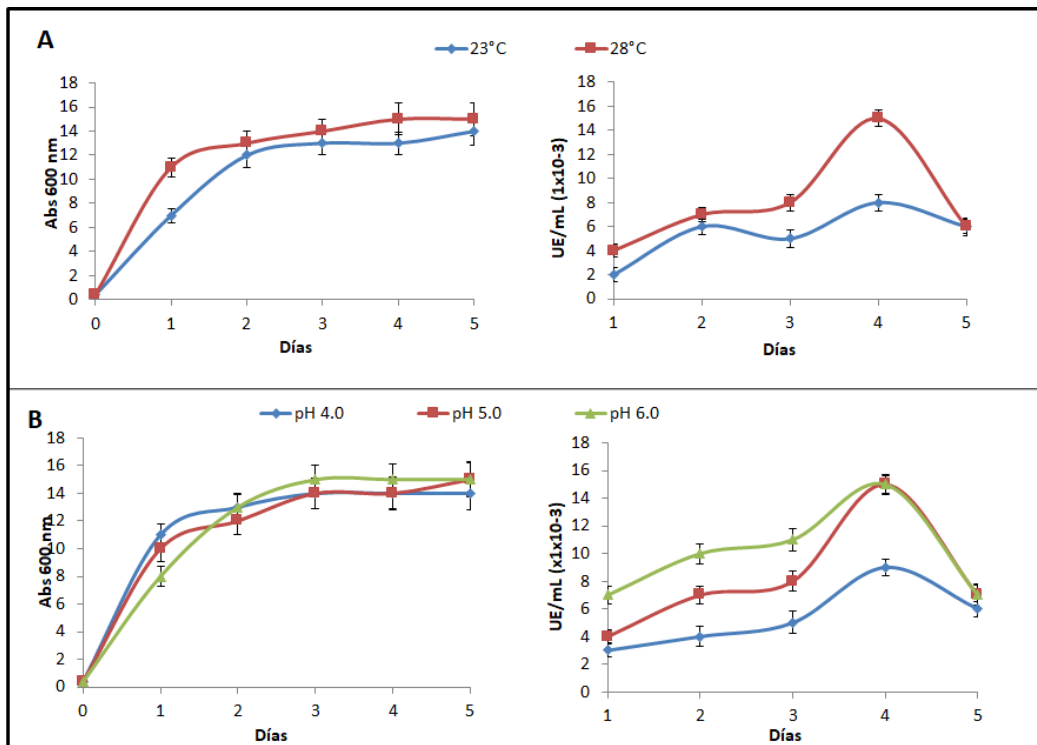
En el caso del jugo vegetal comercial V8, las fuentes de carbono provienen de diversos vegetales y la concentración utilizada fue de 0.3 g/L de azúcares por lo que el bajo rendimiento obtenido puede deberse a la baja concentración utilizada.

La producción de actividad BGL alcanzada en los diversos medios de cultivo antes mencionados se reporta en la **Figura 4.11 B**. La mayor actividad enzimática producida se logró en el medio sintético conteniendo glucosa, alcanzando  $16 \times 10^4$

<sup>3</sup>UE/mL, el doble que lo obtenido en el medio de referencia ( $8 \times 10^{-3}$  UE/mL) y superior a lo alcanzado en los medios con flavonoides ( $2 \times 10^{-3}$  UE/mL). En base a estos resultados se concluye que si bien el mayor crecimiento se logró en los medios YPG y sintéticos con hesperidina o naringina, el óptimo rendimiento de actividad BGL se obtuvo a los cuatro días de cultivo, utilizando medio con glucosa. Por tanto, se continúa con los estudios de optimización con el medio sintético con glucosa.

### **Efecto de Temperatura y pH en el crecimiento y cinética de producción de BGL**

Una vez seleccionado el medio sintético con glucosa, se estudiaron diferentes temperaturas y pH iniciales de cultivo, para evaluar su incidencia en la producción de actividad BGL (**Figura 4.12**). Tanto los máximos de crecimiento alcanzados a 23 y 28 °C como el perfil de las curvas fueron similares (**Figura 4.12 A izq.**). Sin embargo, la producción de actividad BGL fue mayor a 28°C en comparación a lo observado a 23°C (**Figura 4.12 A der.**). En cuanto al pH inicial del cultivo, tampoco se observaron diferencias en el máximo de crecimiento ni en el perfil de las curvas de *I. terricola* en los valores de pH estudiados (**Figura 4.12 B, izq.**). En cuanto a la actividad BGL, no se observaron diferencias para el máximo de actividad producida a los cuatro días de cultivo, cuando el pH inicial fue de 5.0 y 6.0. A pH 4.0 en cambio, la producción fue inferior a lo observado para las anteriores (**Figura 4.12 B, der.**).



**Figura 4.12** Curvas de crecimiento (a la izquierda) y actividad BGL (derecha) de *I. terricola* 0621 en cultivo *batch* en Erlenmeyer, con agitación de 180 rpm a temperaturas de 23 y 28°C (A) y pH iniciales de 4.0, 5.0, 6.0 (B).

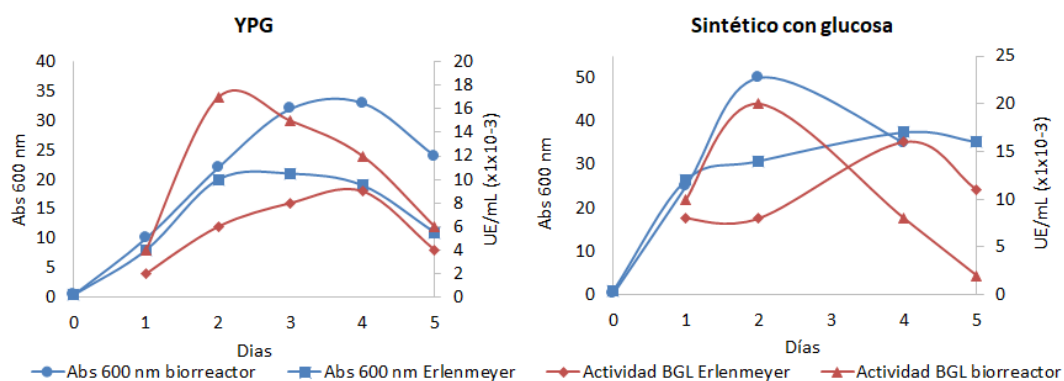
Similarmente, en un estudio realizado por Batra et al., la producción de actividad de una BGL de *Pichia etchellsii* (clonada en *Pichia pastoris*) fue evaluada en un rango de pH inicial de 4.0-8.0 y observaron que la máxima producción se alcanzaba conforme se incrementaba el pH hasta un valor de 7.5 (Batra, Beri, & Mishra, 2014).

En base a estos resultados, se seleccionó el medio sintético para la producción de BGL a una temperatura de 28°C y pH inicial de 5.0 o 6.0. A continuación, se procedió al escalado en biorreactores con el objetivo de obtener cantidades mayores de la enzima.

## Escalado de la producción de BGL *I. terricola* en biorreactores

### *En batch*

Los cultivos en biorreactores se realizaron en condiciones aerobias en medios de cultivo YPG y sintético con glucosa. Puede observarse que para ambos medios, la producción de biomasa es superior en biorreactores lo que coincide con lo reportado para especies no-*Saccharomyces* que crecen mejor en condiciones aerobias (Kassemeyer, 2017). La actividad BGL en biorreactores también es superior y más rápida en comparación con los cultivos en Erlenmeyer (Figura 4.13), sugiriendo que la producción de la enzima se encontraría limitada por la baja disponibilidad de oxígeno en estos últimos. En especial en medio sintético con glucosa, los perfiles de las curvas de actividad BGL son similares a los de producción de biomasa lo que indicaría que la producción de la enzima se encuentra asociada al crecimiento de la levadura. Es destacable que la máxima producción de actividad BGL en biorreactores ocurre 2 días antes en comparación con los cultivos en Erlenmeyer, por lo que mediante este sistema, además de mejorar la productividad, se acortan los tiempos de producción.



**Figura 4.13** Crecimiento y actividad BGL de *I. terricola* en cultivos *batch* en Erlenmeyer y biorreactores. En medios YPG y sintético con glucosa. Los cultivos en Erlenmeyer se realizaron a 180 rpm y T=28°C mientras que en biorreactores las condiciones fueron 650 rpm y T ambiente. El desvío estándar en ningún caso superó el 10%.

### ***Parámetros estequiométricos de crecimiento de *I. terricola****

Como se muestra en la **Figura 4.14**, las tasas de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono en función del tiempo de cultivo, son iguales. Por lo tanto, el cociente entre ellas es de 1, lo que implica que se trata de un metabolismo completamente respiratorio (Morales et al., 2015).

La producción de biomasa en función del tiempo de cultivo se ajustó a un comportamiento exponencial, lo que permitió determinar la ecuación para la conversión de biomasa en medio sintético  $Y = 0.4984 \cdot e^{0.1439x}$  ( $r^2=0.983$ ) donde “Y” es la biomasa en gramos y “x” es el tiempo en horas (**Figura 4.15**). Mediante monitoreo de la producción de biomasa en función del sustrato consumido (**Figura 4.15**) se determinaron los parámetros estequiométricos de crecimiento de *I. terricola* (**Tabla 4.19**), donde  $Y_{x/s}$  e  $Y_{CO_2/s}$  representan el rendimiento en gramos de biomasa y de  $CO_2$  en función de los gramos de sustrato consumido, respectivamente; y el parámetro b son los moles de oxígeno consumidos en función del consumo del sustrato (**Tabla 4.19**). Los balances de carbono y de grado de reducción están relacionados a los moles de carbono y la energía aportada por el sustrato, respectivamente, que se distribuyen en los productos y el crecimiento celular (**Tabla 4.19**). El hecho de que estos últimos sean cercanos a 1 permite concluir que no hubo síntesis significativa de ningún producto más que biomasa y dióxido de carbono. Si bien la BGL se produce en forma extracelular, la producción de la misma es despreciable como para tener un impacto significativo en el balance de carbono. Por último, el parámetro  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento, cuanto mayor es su valor, mayor es la velocidad de crecimiento del organismo en esa condición (**Tabla 4.19**). De este estudio entonces se conocieron los parámetros estequiométricos vinculados al crecimiento de *I. terricola*, en medio sintético con glucosa. Estos parámetros fueron de utilidad para el siguiente paso, el diseño de un *batch* alimentado.



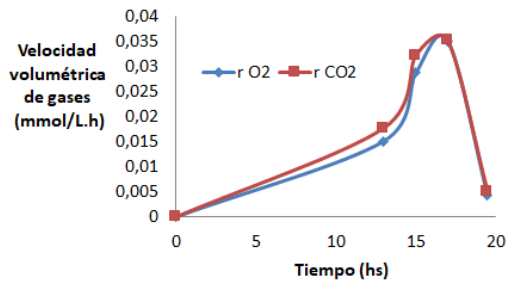


Figura 4.14 Consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono en función del tiempo, en cultivo en *batch*.

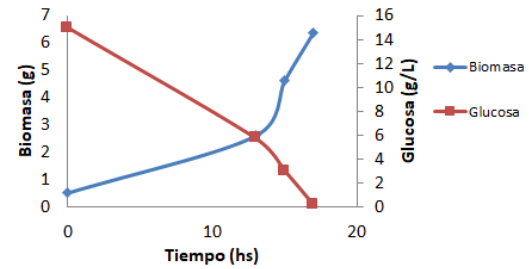


Figura 4.15 Producción de biomasa y consumo de glucosa en función del tiempo de cultivo en *batch*. La ecuación de la conversión exponencial de biomasa determinada:  $Y = 0.4984 \cdot e^{0.1439x}$  ( $r^2=0.983$ ).

Tabla 4.19 Parámetros estequiométricos de *I. terricola* determinados a partir del monitoreo del cultivo *batch* en biorreactor usando medio sintético.

$Y_{x/s}$	$Y_{CO_2/s}$	b	Balance de Carbono	Balance grado de reducción	$\mu$ ( $h^{-1}$ )
0.488	0.567	0.511	1.055	1.023	0.144

$Y_{x/s}$  e  $Y_{CO_2/s}$  representan el coeficiente de rendimiento celular y de  $CO_2$  basado en el consumo de fuente de carbono, respectivamente.

b son los moles de  $O_2$  consumidos relacionados con el consumo de sustrato.

El balance de carbono y el balance del grado de reducción representan la forma en que el carbono y la energía del sustrato se distribuyen en los productos de la reacción de crecimiento.

$\mu$  es la tasa de crecimiento específica (en  $h^{-1}$ ).

### En batch alimentado

Teniendo en cuenta que la mayoría de los procesos de producción de proteínas se basan en protocolos de cultivos semi-continuos tipo *batch* alimentados, se realizó un experimento utilizando medio sintético con el objetivo de aumentar la productividad de la BGL. Este proceso permite controlar la tasa de alimentación de glucosa, evitando su acumulación, sin restringir el crecimiento.

Los parámetros fundamentales de fermentación se estimaron previamente a partir de los datos de cultivo en *batch*. Para una biomasa deseada de 30 g/L, de acuerdo con la ecuación 1 basado en los parámetros fisiológicos de la **Tabla 4.19** ( $Y_{x/s} = 0.488$  gX/gS y un  $\mu_{m\acute{a}x.} = 0.144$   $h^{-1}$ ), los parámetros para el cultivo fueron:  $X_0 = 6$  g/L,  $V_0 = 3.0$  L y  $V_f = 4.0$  L,  $SF=200$  g/L,  $F= 50$  mL/h, donde  $X_0$  y  $V_0$  son la concentración de biomasa y el volumen en la condición inicial respectivamente,  $V_f$  es el volumen final,  $SF$  es la concentración de alimentación del sustrato,  $F$  es el flujo de alimentación.

El porcentaje de rendimiento de biomasa obtenido al final del proceso fue del 95%, sin embargo, en cuanto a la producción de BGL, la actividad enzimática alcanzada ( $20 \times 10^{-3}$  UE/mL) fue prácticamente la misma que lo obtenido en cultivos en *batch* en biorreactor ( $18 \times 10^{-3}$  UE/mL) y Erlenmeyer ( $16 \times 10^{-3}$  UE/mL). Este resultado coincide con lo reportado por Batra et al., 2014 quienes observaron que, en cultivo en biorreactores co-alimentados con metanol y sorbitol, la producción de biomasa se incrementó cuatro veces y la actividad BGL fue similar a los cultivos en Erlenmeyer (Batra et al., 2014). Este comportamiento podría deberse al hecho de que algunas enzimas se sintetizan en mayor cantidad cuando el microorganismo crece a gran velocidad y en el caso del *batch* alimentado el sustrato se va suministrando de manera de que la velocidad de crecimiento no sea máxima.

En resumen, si bien se logró un incremento en la producción de actividad BGL en cultivos en Erlenmeyer en medio sintético con glucosa, en cuanto al sistema de biorreactores la producción BGL en YPG fue muy similar a la del medio optimizado. Adicionalmente, el medio sintético con glucosa optimizado es más caro y más tedioso de elaborar que el de rutina por lo que no se justificaría el uso de este medio a nivel industrial. Por lo tanto, se plantea el desafío de mejorar el rendimiento de producción de enzima mediante estrategias adicionales como por ejemplo, la expresión de la enzima de interés en otro organismo como *S. cerevisiae*.

## 4.5 EXPRESIÓN DE BGL I. TERRICOLA EN S. CEREVISAE

### **Organismos genéticamente modificados: definición y normativas vigentes**

Según la *Food and Drug Administration* (FDA), un organismo genéticamente modificado (OGM) es “aquel cuyo material genético (ADN) ha sido alterado a través de un proceso llamado ingeniería genética” (Food and Drug Administration, 2020). El desarrollo de estos organismos es cada vez más accesible gracias a la disponibilidad actual de técnicas de ingeniería genética que permiten aislar genes concretos, modificarlos en el laboratorio y reintroducirlos en el organismo original o en otro distinto. La enología y la viticultura no han sido ajenas a estos desarrollos y se ha comenzado a aplicar ingeniería genética sobre la vid y microorganismos vínicos (Manzanares et al., 2003; Vivier, & Pretorius, 2002).

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) es el organismo encargado de establecer las normas que regulan las prácticas que pueden realizarse para la producción de vinos, estableciendo los productos que pueden ser usados, las normativas que deben cumplirse y los procedimientos analíticos con metodologías estandarizadas. Todos los documentos están disponibles en la web en al menos tres idiomas: español, francés, inglés <http://www.oiv.int/>. Aquellos países que sean miembros de este organismo deberán acatar las normativas que éste imparte. La membresía no es obligatoria pero sí recomendada.

Durante los últimos veinte años se han llevado a cabo mejoras genéticas dirigidas en cepas vínicas, y hoy en día existen disponibles levaduras modificadas genéticamente que han sido reconocidas por la (FDA) como seguras o GRAS (por sus siglas en inglés “generally recognized as safe”) (Husnik et al., 2007; Tobergte & Curtis, 2013). La OIV por su parte, se encuentra en proceso de desarrollar un protocolo que establezca las pautas y estándares para el uso de OGM en la producción de vinos. Actualmente, apoya la investigación en actividades que involucran organismos modificados genéticamente pero no el uso comercial de los mismos en vinificación. En general, la aplicación comercial de OGM genera

controversias, y en Uruguay no se emplean en vinificación. Sin embargo, esta tendencia se viene desarrollando en otros países como Australia y Nueva Zelanda, Estados Unidos y Canadá. Estos países no son miembros de la OIV y el uso de levaduras genéticamente modificadas en la producción de vinos ya ha sido aprobado (Pretorius, Curtin, & Chambers, 2012).

### **Producción recombinante de BGLs en *Saccharomyces***

*S. cerevisiae* se caracteriza por ser una excelente fermentadora y es uno de los organismos aceptados en la industria alimentaria. Cabe destacar que la información depositada en la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (<http://www.wipo.int/patents/en/>) muestra que existen más de 700 patentes que utilizan levaduras recombinantes entre las cuales, algunas modificaciones genéticas están dirigidas a potenciar o conferir características que optimicen el proceso de vinificación (Guillaume, Delobel, Sablayrolles, & Blondin, 2007; Malherbe, du Toit, Cordero-Otero, Van Rensburg, & Pretorius, 2003; Smit, Cordero-Otero, Lambrechts, & Pretorius, 2003). Como se mencionó anteriormente y en contraposición a lo que ocurre con las levaduras no-*Saccharomyces*, *S. cerevisiae* presentan baja o nula expresión de actividades hidrolíticas tales como BGLs (Arroyo, Cordero, Serrano, & Valero, 2010; López M.C., Mateo & Maicas, 2015; Cordero Otero et al., 2003; Fia, Giovani, & Rosi, 2005; Maturano, Assof, & Nally, 2015; de Ovalle, Brena, Fariña, & González-Pombo, 2016; Pérez et al., 2011; Plessis et al., 2017).

Una alternativa al clonado y expresión de estas enzimas para su aplicación en forma exógena, sería la utilización de una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente mediante la incorporación de un gen BGL, cuya expresión no presente inhibición en las condiciones de fermentación. Mediante esta estrategia, la cepa adquirirá la capacidad de hidrolizar precursores de aromas a la vez que se asegura una fermentación completa. Idealmente, la incorporación del gen BGL de interés debe realizarse bajo el control de un promotor que se exprese en las condiciones de fermentación, lo que conduciría a la producción de la enzima durante todo el proceso (Van Rensburg, Strauss, Lambrechts, Cordero-Otero, &

Pretorius, 2007). En este trabajo se abordó la co-transformación con un *cassette* de expresión (generado mediante PCR de fusión y clonado en vector pWJ1042) y fragmentos flanqueantes al sitio YPRC $\Delta$ 15 del cromosoma XVI de *S. cerevisiae*, de manera de dirigir el ensamblado *in vivo* de los tres fragmentos y la recombinación del producto ensamblado al *locus* YPRC $\Delta$ 15.

Adicionalmente, el clonado del producto de fusión en el vector pESC-URA y la transformación de *S. cerevisiae* con los vectores resultantes, digeridos (linealizados) permitiría obtener una cepa recombinante para optimizar la producción de la enzima de interés.

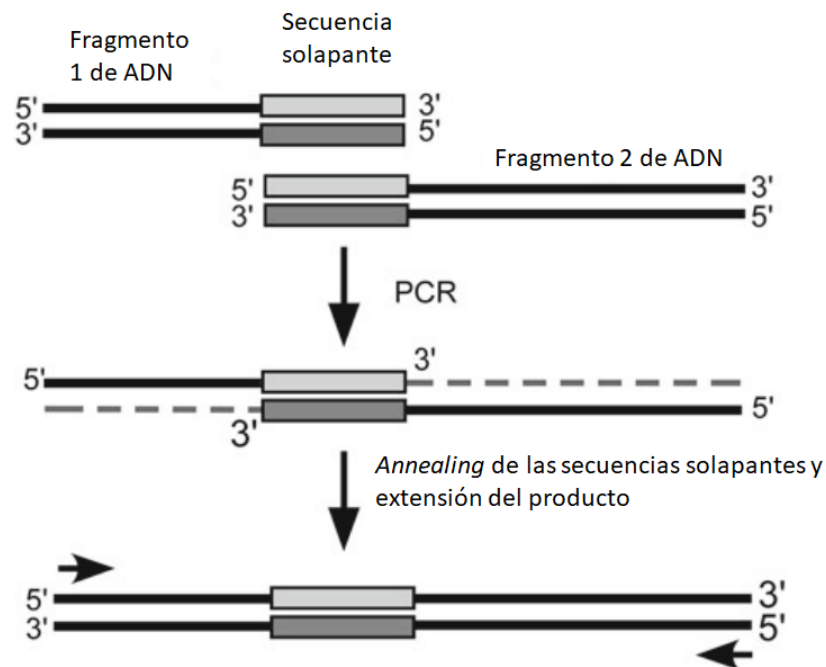
La cepa utilizada de *S. cerevisiae* T73-4 porta una doble disrupción de ambas copias del gen URA3 (Puig, Ramón, & Pérez-Ortín, 1998) y por lo tanto, es incapaz de crecer en un medio en ausencia de este compuesto. El gen URA3 codifica para la enzima Orotidina 5'-fosfato Descarboxilasa (ODCasa) involucrada en la síntesis de pirimidinas. Luego de la transformación, la presencia del gen URA3 en la levadura restaura la actividad de la ODCasa, lo que facilita el crecimiento en medios no suplementados con uracilo o uridina permitiendo la selección de la levadura portadora del gen.

### ***Estrategia 1: Co-transformación de S. cerevisiae T73-4***

La estrategia planteada en esta etapa se basó en el trabajo publicado por Bai Flagfeldt et al. (2009), en el cual evaluaron diferentes sitios de recombinación en el genoma de *S. cerevisiae* mediante la incorporación de un *cassette* conteniendo el gen de una enzima  $\beta$ -galactosidasa y determinaron en cuál(es) la expresión era máxima (Bai Flagfeldt, Siewers, Huang, & Nielsen, 2009b).

En este trabajo, los productos de fusión se construyeron a partir de las secuencias de un promotor (p), la enzima (BGL) y el terminador CYCt de *S. cerevisiae*. Luego, mediante el clonado en pWJ1042 se incorporó el gen URA3 de *K. lactis* generándose los *cassettes* a partir de la digestión del vector conteniendo el inserto.

En la **Figura 4.16** se esquematiza en qué consiste una PCR de fusión. Al igual que en la PCR tradicional, una porción del cebador hibrida con el fragmento 1 pero la diferencia es que éste contiene además una “cola”, es decir una secuencia que se solapa a un segundo producto que se desea unir. Todos los fragmentos a solapar se generan inicialmente mediante PCR tradicional. En la PCR de fusión dichos fragmentos se incuban en el mix de reacción con cebadores *forward* y *reverse* de los extremos del producto final que se desea generar. El resultado final será un único producto conformado por todos los fragmentos de ADN que contengan secuencias solapantes (Cha-Aim, Hoshida, Fukunaga, & Akada, 2012).



**Figura 4.16** Esquema de PCR de fusión. Adaptado de Cha-Aim et al., 2012

***Estrategia 2: Transformación de *S. cerevisiae* T73-4 con vectores de expresión de la BGL***

En la segunda estrategia los productos de fusión promotor (ADH1p, ACT1p)::BGL::CYCt y ENDpBGL::CYCt generados tal como se describió previamente, fueron clonados en el vector pESC-URA. Este vector está diseñado para la expresión y el análisis funcional de genes eucariotas en esta levadura, es episomal y contiene como marcador de selección de transformación el gen URA3 de *S. cerevisiae*. Con estos vectores se puede introducir uno o dos genes clonados en una cepa huésped de levadura (<https://www.addgene.org/vector-database/7711/>). Para su aplicación en fermentaciones, la desventaja del uso de esta estrategia es que se introducen secuencias de origen bacteriano (como el gen de resistencia a ampicilina), volviendo a la cepa no apta para el uso en alimentos. Sin embargo, la cepa producida podría ser útil para la optimización de la producción de la enzima BGL *I. terricola*.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la búsqueda de la secuencia codificante de BGL *I. terricola* y la expresión de esta enzima en *S. cerevisiae* T73-4.

### **Obtención de secuencias parciales de la proteína**

Mediante BLASTp de los fragmentos trípticos de la proteína, se obtuvieron las secuencias: WVNGIGIGAR y VWVDLHGAPGSQNGFDNSGLR. Estos fragmentos

coincidían con otras proteínas reportadas en la base de datos NCBI, tales como “hypotetical protein” de *Candida galbrata* y de enzimas tipo glucan- $\beta$ -1.3-glucosidasas de *Lodderomyces elongisporus* y *Kluveromyces marxianus*. En todos los casos, las coincidencias tuvieron un score mayor al 50%. En este primer estudio de espectrometría de masas los datos que podían extraerse de la proteína pura eran escasos debido a que el genoma de *I. terricola* no estaba secuenciado y tampoco se encontraban secuencias disponibles de enzimas BGLs de este organismo. Se realizó un análisis BLASTp de los fragmentos obtenidos mediante espectrometría de masas y se colectaron varias secuencias coincidentes con enzimas de tipo glucan- $\beta$ -1,3 glucosidasas. Mediante el alineamiento de las secuencias de dichas proteínas se observó que en las secuencias analizadas, VWVDLHGAPGS**QNGFDNSGLR** se encontraba en las posiciones de los aminoácidos 203-223 mientras que el fragmento **WVNGIGIGAR** en la posición 413-422 (**Figura 4.17**). Puede observarse que el primer fragmento se encuentra altamente conservado (**Figura 4.17 A**) para todas las BGLs incluidas en este estudio, mientras que el segundo fragmento es más variable (**Figura 4.17 B**). De dichos fragmentos se seleccionaron para el diseño de cebadores degenerados las porciones (resaltadas en negrita) **QNGFDN** del fragmento 1 (cebador *forward*: 5'-CARAAYGGNTTYGAYAAY-3' y **WVNGIG** del fragmento 2 (cebador *reverse*: 5'-CCRATNCCRTTNACCCA-3').





**Figura 4.17** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de enzimas tipo glucan-β-1,3-glucosidasas de varios organismos. Se resaltan en amarillo el fragmento WVVDLHGA PGSQNGFDNSGLR (A) y WVNGIGIGAR (B).

## Amplificación de fragmentos parciales del gen de la BGL por PCR

### *Extracción de ADN genómico de I. terricola*

Para la extracción de ADN genómico de *I. terricola* se emplearon diferentes protocolos reportados en bibliografía. En el primero, el más sencillo, se emplean soluciones *buffers* de lisis y hielo seco para la ruptura de la membrana y la liberación del ADN al medio extracelular (Harju et al., 2004). En el método de da Silva et al., 2012, se procede al intercalado de pasos de hervido y enfriado para favorecer la ruptura de las células, complementando con soluciones *buffer* de lisis. Amberg et al., 2005 agregan *glass beads* para la optimización de la ruptura celular y Tortajada et al. (2009), incluye el uso de un extracto de enzimas líticas (Glucanex). En la **Tabla 4.20** se resumen los rendimientos obtenidos mediante los diferentes métodos de extracción empleados, puede observarse que mediante los métodos más sencillos (Harju et al., 2004 y da Silva et al, 2012) los rendimientos son muy bajos mientras que los métodos que emplean otros agentes adicionales para la ruptura de las células (Amberg et al, 2005 y Tortajada et al., 2009) los rendimientos obtenidos son el doble o más que para los anteriores, lo que sugiere que el paso crítico en la extracción de ADN genómico en estos organismos, es el paso de la ruptura de pared celular.

**Tabla 4.20.** Rendimientos de cantidad de ADNg (en ng/ $\mu$ L) obtenidas mediante los diferentes métodos de extracción empleados.

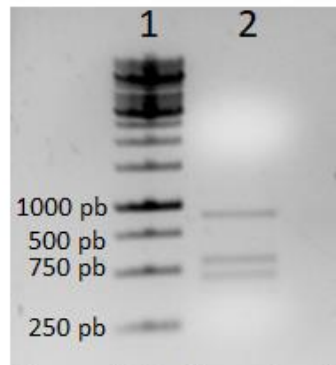
Método	Cant. de ADNg (ng/ $\mu$ L)
Harju et al., 2004	$\leq 11$
Amberg et al, 2005	$\leq 25$
Tortajada et al., 2009	$\leq 20$
Almeida da Silva et al, 2012	$\leq 8$
YeaStar genomic DNA kit (zymo research)	$\geq 50$

Mediante los métodos reportados en bibliografía se obtuvieron bajas cantidades de ADN (**Tabla 4.20**) y además, el material genético contenía grandes cantidades de ARN lo que implicaba pasos sucesivos de tratamiento con RNAsas para su eliminación. Además, esto dificultaba la estimación de la concentración mediante la relación de absorbancias A260/A280 ya que la contaminación con ARN sobreestimaba el resultado de la cantidad de ADN de la muestra. Fue por eso que se recurrió en última instancia al empleo del kit Zymo Research mediante el cual se mejoró el rendimiento y la calidad de ADNg en cuanto a que el mismo no se degradó durante el proceso y se obtenía con un elevado grado de purificación.

### ***Obtención de fragmentos con cebadores degenerados***

Para la optimización de las condiciones de PCR, se variaron las siguientes condiciones: temperatura de *annealing*, tiempos de desnaturalización y extensión. También se emplearon enzimas ADN polimerasas con diferentes procesividades y fidelidades: DNA polymerase (Thermo), DNA polymerase (Qiagen), Ranger mix (Bioline).

En la **Figura 4.18** se muestran los productos obtenidos por PCR en las condiciones optimizadas, los cuales fueron clonados en vector Topo TA en *E. coli* DH5 $\alpha$ , purificados y enviados a secuenciar a MACROGEN (Corea del Sur).



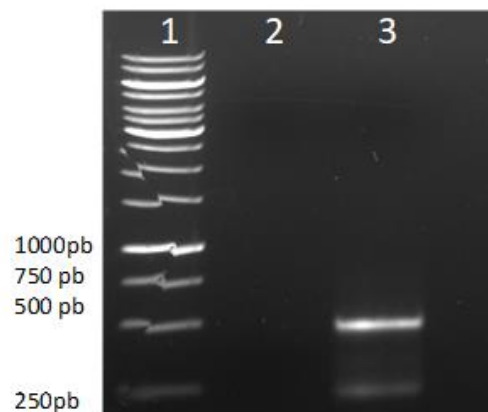
**Figura 4.18** Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de pb geneRuler 1kb DNA ladder; carril 2: productos de PCR.

Puede observarse que se obtuvieron tres productos de PCR, dos de ellos de aproximadamente 500 pb y uno de un tamaño cercano a 1000 pb. Luego de la purificación, clonado y secuenciación de los productos, se analizaron las secuencias de los mismos, no obteniéndose coincidencia alguna con BGLs. Como se mencionó previamente, el hecho de que el genoma de *I. terricola* no estuviera secuenciado llevó a que los datos obtenidos mediante espectrometría de masas fueran poco reveladores ya que correspondían a secuencias de BGLs de otras especies, reportadas en la base de datos NCBI. Las porciones de los fragmentos resultados de espectrometría de masas, que se usaron para el diseño de cebadores degenerados (QGNGFDN y WVNGIG) eran muy cortas como para permitir un diseño algo más preciso de cebadores. Gran parte de los aminoácidos de los fragmentos, son codificados por más de un codón lo que incrementó la degeneración de los cebadores. Además, una vez conocida la secuencia de BGL (ver Anexo) se identificó que para el fragmento WVNGIG, la proteína contenía un residuo de Leucina en lugar del de Isoleucina identificado por espectrometría de masas. Estos aminoácidos son codificados por codones muy diferentes entre sí, lo que probablemente dificultó la especificidad de los oligos diseñados. Estas son posibles razones por las cuales no se logró obtener productos coincidentes con BGLs. Además, la obtención de productos se logró solamente cuando la temperatura *annealing* fue muy baja (35°C) lo que incrementa aún más las posibilidades de que los cebadores hibriden de manera inespecífica. Vale destacar

que con el objetivo de disminuir la probabilidad de obtener productos inespecíficos, se usó ADNc como alternativa al ADNg como molde de la PCR, pero tampoco se obtuvieron productos coincidentes de BGL mediante esta estrategia.

Quatrini et al, 2008 diseñaron cebadores degenerados mediante el alineamiento de genes BGLs de levaduras y tuvieron éxito en la obtención de productos de interés para uno de los pares diseñados. Además, estos resultados fueron exitosos para el aislamiento de genes BGL concretamente de cepas de levaduras de ambientes enológicos, lo que nos motivó a hacer uso de los mismos (Quatrini et al., 2008).

Luego de varios intentos de optimizar las condiciones de PCR, se obtuvieron productos candidatos solo para la combinación de cebadores GKLf/GLSYr (**Figura 4.19**). Los productos obtenidos fueron clonados en vector Topo TA en *E. coli* DH5 $\alpha$  y enviados a secuenciar. Sin embargo, una vez más, las secuencias de dichos productos no coincidían con BGLs y la temperatura de *annealing* tan baja (40°C) incrementó la probabilidad de obtener productos inespecíficos.



**Figura 4.19** Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de pb geneRuler 1kb DNA ladder; carril 2: PCR usando oligos Dwf/GKLr; carril 3: PCR usando oligos Gklf/GLSYr.

## **Amplificación de la secuencia codificante una vez conocida la secuencia**

Mediante las estrategias de uso de cebadores degenerados y de bibliografía, no fue posible hallar secuencias coincidentes con BGLs. Como estrategia alternativa se planteó la secuenciación del genoma de la levadura nativa lo que además de permitir la identificación de la proteína de interés, abriría un abanico de posibilidades para explotar dicho genoma, en la búsqueda de otras actividades enzimáticas de interés en la industria enológica. Este objetivo fue posible mediante la financiación de un proyecto de investigación al Fondo María Viñas de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación ANII (responsables: Dra. Paula González Pombo y Dra. Ana Ramón).

### ***Caracterización del gen BGL g<sub>4180</sub> de *I. terricola****

En el marco del proyecto FMV, la Msc. Juliette Dourron desarrolló su tesis de maestría en Ciencias Biológicas (PEDECIBA), llevando a cabo el ensamblado y la anotación del genoma de *I. terricola* y su análisis hacia la búsqueda de actividades enzimáticas de interés en enología. Una vez realizado el ensamblado y la anotación y a partir de los datos del análisis de espectrometría de masas de la proteína pura, fue posible identificar al gen g<sub>4180</sub> (ver Anexo) como el codificante para la BGL objeto de este estudio.

A partir de la secuencia deducida, fue posible determinar que se trata de una enzima de tipo glucan- $\beta$ -1,3-glucosidasa conformada por 430 aminoácidos y un tamaño teórico de 49.6 kDa, muy cercano al valor obtenido experimentalmente mediante cromatografía de exclusión molecular (48 kDa) (de Ovalle et al., 2018). El punto isoeléctrico determinado mediante la herramienta Isoelectric point de ExPASy, mostró que la proteína tiene un pI teórico de 4.4 mientras que el experimental fue de 3.5 (de Ovalle et al., 2018). Esta diferencia de casi una

unidad puede deberse a que los pl teóricos tienen en cuenta la contribución de las cargas debidas a las cadenas laterales de los aminoácidos contribuyentes, principalmente residuos ácidos y básicos, pero no las interacciones debidas al plegamiento ni las modificaciones post-traduccionales que pueden modificar la carga neta de la proteína.

Mediante utilización de la herramienta BLASTp en Uniprot, se observó que la secuencia de aminoácidos coincide un 73% con la de la enzima glucan- $\beta$ -1,3-glucosidasa de *I. orientalis* y en menor porcentaje a otras enzimas de este tipo, reportadas para otras levaduras (*Pichia angusta*, *Brettanomyces bruxllensis*, entre otras). En todos los casos, estas proteínas pertenecen a la familia GH5, una de las más grandes familias y cuyas enzimas se encuentran distribuidas entre Archaea, bacterias y eucariotas y principalmente en hongos y plantas. En cuanto a los tipos de enzimas en esta familia se encuentran: endo-glucanasas (celulasas) y endo-mananasas, exo-glucanasas, exo-mananasas. BGLs y  $\beta$ -manosidasas ([Cazypedia.org GH\\_GH5 family](http://Cazypedia.org/GH_GH5_family)).

A nivel de nucleótidos, la estructura génica de 1290 pb mostró que el gen está compuesto por un único exón. El hecho de carecer de intrones presenta una enorme ventaja ya que el producto de interés puede obtenerse directamente usando ADNg como molde. A continuación, se diseñaron cebadores ahora sí específicos, para la BGL g<sub>4180</sub>, mediante los cuales se logró obtener la secuencia codificante por PCR. Dicho producto fue clonado en el vector Topo TA (ThermoFischer) transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$  y enviado a secuenciar y afortunadamente, la secuencia coincidió en un 100%.

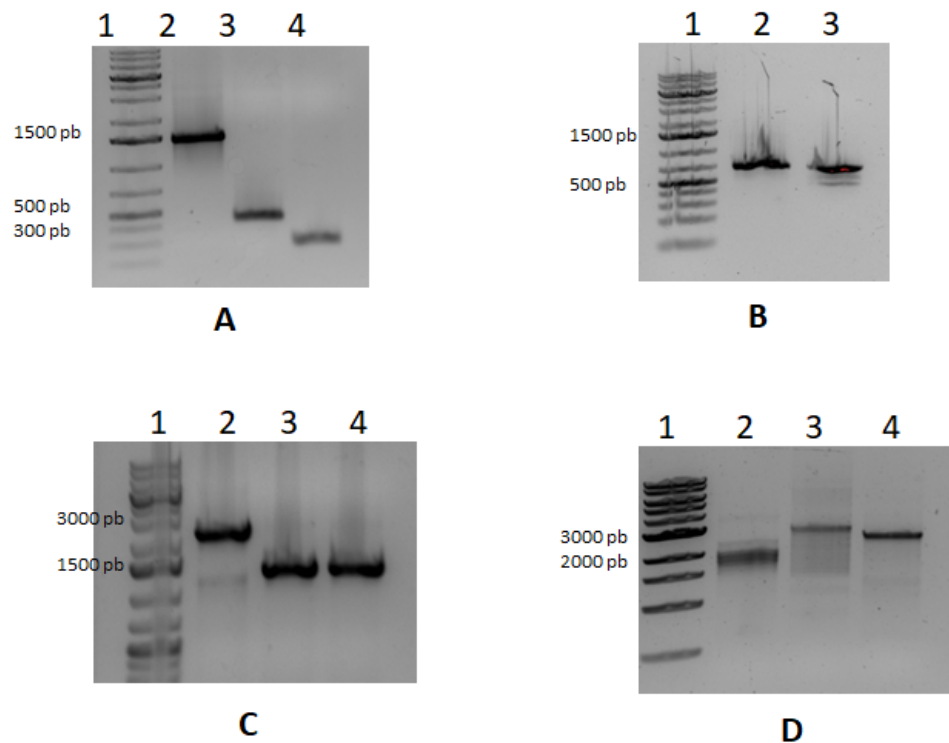
## Estrategias de generación de una cepa de *S. cerevisiae* para la expresión de la BGL g4180

### *Co-transformación de la cepa S. cerevisiae para la expresión de la BGL I. terricola*

Para la generación de una cepa de *S. cerevisiae* que exprese la BGL *I. terricola*, la estrategia abordada fue la generación de *cassettes* de expresión y su inserción en el genoma de esta levadura. Se eligieron tres promotores para la construcción de los diferentes *cassettes*: ADH1p, ACT1p y ENDp. El promotor ADH1p de alcohol deshidrogenasa 1, es responsable de la producción de etanol durante el crecimiento en glucosa (Partow, Siewers, Bjørn, Nielsen, & Maury, 2008); 2); el promotor ACT1p es un promotor constitutivo fuerte, que regula la expresión de actina (Bai Flagfeldt, Siewers, Huang, & Nielsen, 2009a). Por último, mediante el promotor ENDp de la propia BGL, se intentaba determinar si la expresión de la enzima era posible en *S. cerevisiae* bajo el control de su propio promotor.

El primer paso para la construcción de los *cassettes* consistió en la obtención *in vitro* mediante PCR del material génico necesario: promotores, BGL y terminador. A partir de ADNg de *S. cerevisiae* T73-4 se obtuvieron los promotores ADH1p, ACT1p y el terminador fuerte CYCt (**Figura 4.20 A**) y las regiones flanqueantes up y down (**Figura 4.20 B**). A partir del ADNg de *I. terricola* se obtuvo la secuencia codificante de la BGL y la misma con su promotor endógeno (**Figura 4.20 C**). Mediante PCR de fusión, se obtuvieron los productos de fusión (**Figura 4.20 D**) que a continuación fueron clonados en vector pWJ1042, y secuenciados. La calidad de la secuencia del producto de fusión ACTp::BGL::CYCt era baja en la porción del promotor por lo que se descartó para los estudios posteriores. Los *cassettes* se generaron por digestión con las enzimas AhdI y pspOMI y se usaron para la transformación de *S. cerevisiae* T73-4. Con los *cassettes* y las regiones up y down se realizó la co-transformación.





**Figura 4.20** Productos de PCR para fusión y productos de fusión

**A;** Electroforesis de productos de PCR promotores y terminador, en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de pb geneRuler 1kb plus DNA ladder; carril 2: producto de PCR ADHp; carril 3: producto de PCR ACTp; carril 4: producto de PCR CYCt y **B:** carril 1: marcador de pb geneRuler 1kb plus DNA ladder, carriles 2 y 3: fragmentos up y down, respectivamente.

**C;** Electroforesis de productos de PCR de BGL *I. terricola* en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de pb geneRuler 1kb plus DNA ladder; carril 2: producto de PCR ENDpBGL; carril 3: producto de PCR BGL (oligos para ACTp y CYCt); carril 4: producto de PCR BGL (con oligos para ADHp y CYCt).

**D:** Electroforesis de productos de PCR de fusión (cassettes) en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de pb 1kb NEB; carril 2: producto PCR fusión ACTp::BGL::CYC; carril 3: producto de PCR de fusión ADHp::BGL::CYC; carril 4: producto PCR de fusión ENDpBGL::CYC.

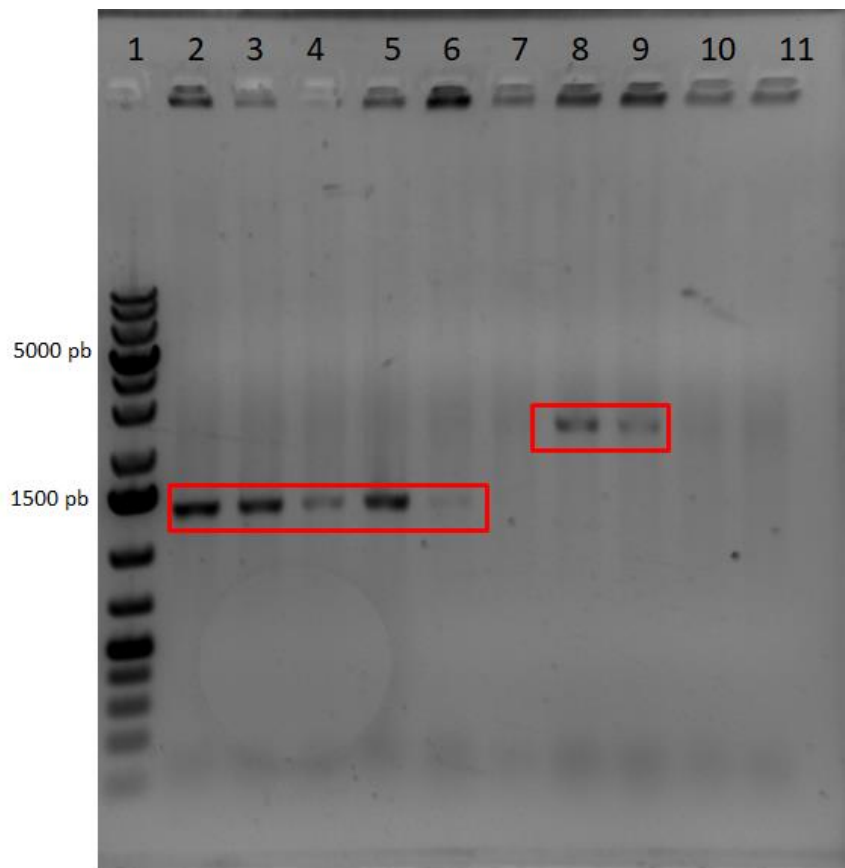
Desafortunadamente, pese a varios intentos modificando condiciones de co-transformación, no se obtuvo éxito. Se probaron diferentes protocolos de transformación con LiAc descritos para *S. cerevisiae* sin éxito para ninguno de ellos (Gietz, St Jean, Robin, & Schiestl, 1992; Gietz & Schiestl, 2007; Puig, Ramón & Pérez-Ortín 1998).

Mediante esta estrategia se pretendía generar una cepa que exprese la BGL y que se encuentre libre de secuencias bacterianas (como los genes de resistencia a antibióticos) de manera de que sea segura para su uso en alimentos. Como alternativa, se planteó recurrir al uso del vector de expresión pESC-URA. Como desventaja, el resto de las secuencias que forman parte del vector también se

incorporan. Sin embargo, la cepa generada podría ser de utilidad para la evaluación de producción de actividad BGL durante el proceso de vinificación a escala de laboratorio o para la optimización de la producción de la enzima en biorreactores.

### ***Transformación con vectores de expresión***

Los vectores pESC-URA-ADHp::BGL::CYCt y pESC-URA-ENDpBGL::CYCt fueron digeridos (con la enzima NotI) previo a la transformación, de manera de favorecer la integración genómica. De la transformación mediante electroporación de *S. cerevisiae* T73-4 se obtuvieron varios transformantes, tanto para pESC-URA-ADHp::BGL::CYCt como para pESC-URA-ENDpBGL::CYCt. La presencia de inserto se analizó mediante PCR de colonia. En el primer caso, se utilizaron los cebadores específicos de BGL (bgl-it-fw y bgl-it-rv), por lo que el producto esperado era del tamaño del gen de la BGL *I. terricola* (1290 pb). En el segundo, se emplearon los cebadores END-bglu-fw y el bgl-it-rv por lo que el tamaño del producto esperado era 2337 pb. Afortunadamente, las colonias 1-5 de pESC-URA-ADHp::BGL::CYCt y las colonias 2 y 3 de pESC-URA-ENDpBGL::CYCt contenían el inserto (**Figura 4.21**).

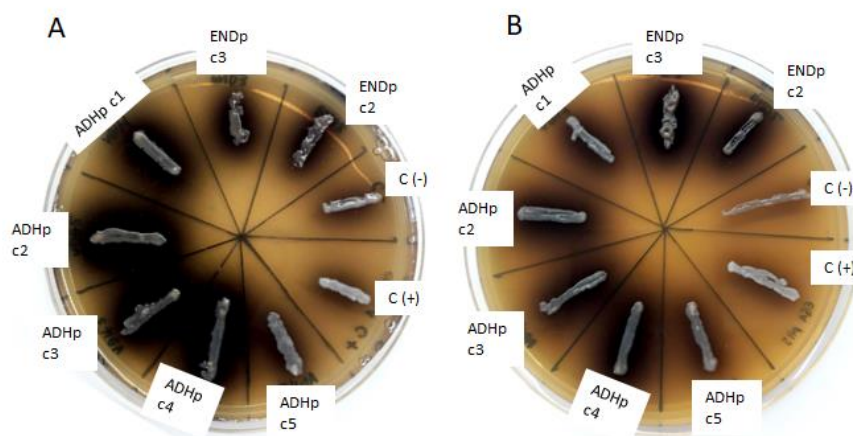


**Figura 4.21** Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador de pb geneRuler 1kb plus DNA ladder; carriles 2-6: PCR colonia de transformantes 1-5 de ADHp::BGL::CYC; carriles 7-11: PCR colonia de transformantes 1-5 de ENDpBGL::CYC.

### Expresión de BGL g<sub>4180</sub> de *I. terricola*

Para determinar la expresión de BGL *I. terricola* en *S. cerevisiae*, se realizó un *screening* en medio EGA en el cual, cómo ya se mencionó, la actividad se vislumbra por la aparición de una halo marrón oscuro (Mahadevan & Eberhart, 1964). Como control del ensayo se empleó la cepa *S. cerevisiae* T73-4 transformada con el vector sin inserto (control negativo) y la propia *I. terricola* 0621 como control positivo. Los clones conteniendo el inserto se inocularon en placas de EGA, a pH 4.0 y 5.0. Del resultado se destaca que si bien el control negativo posee algo de actividad basal, la actividad expresada en los clones es notoriamente superior, en los dos valores de pH ensayados (4.0 y 5.0) (**Figura 4.22**). Puede observarse que además, los clones de ADHp (c1-c5) mostraron mayor actividad incluso que el control positivo para las dos condiciones de pH ensayadas. Este último resultado puede deberse, a que la cepa *I. terricola* 0621

(control positivo) tal como se mencionó (Sección 4.1) presenta mayor actividad a las 72 hs de incubación, tiempo en el cual la actividad de los clones de *S. cerevisiae* cubrían la totalidad de la placa impidiendo una buena resolución. Algo a destacar es que los clones de ADHp a pH 4.0 mostraron mayor actividad que a pH 5.0. Además, el promotor ADH1p de la isozima alcohol deshidrogenasa 1 de *S. cerevisiae* es adecuado para la expresión de genes a altas concentraciones de glucosa (Partow, 2008) condición típica del mosto.



**Figura 4.22** Screening de actividad en medio EGA a pH 4.0 (A) y 5.0 (B), 24 hs de incubación a temperatura 28°C, de los clones de *S. cerevisiae* conteniendo los *cassettes* de transformación ADHp colonias c1-c5 y colonias c2-c3 para ENDp. Como control negativo se empleó T73-4 transformada con el vector pESC-URA y como control positivo, *I. terricola* 0621.

En resumen, se logró caracterizar el gen BGL *I. terricola* observándose que se correspondía a una enzima  $\beta$ -1,3-glucosidasa de la familia GH5. A partir de la secuencia codificante, se construyeron *cassettes* de expresión que fueron clonados en pESC-URA e introducidos en *S. cerevisiae* y los clones obtenidos expresaron actividad BGL a pH 4.0 y 5.0. Los resultados sugieren que las cepas generadas de *S. cerevisiae* conteniendo el gen de la BGL podrían ser útiles para producir la enzima BGL.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El trabajo desarrollado durante esta tesis permitió profundizar en el conocimiento de BGLs de cepas no-*Saccharomyces* nativas y desarrollar herramientas que posibiliten su utilización enológica para generar vinos de calidad con características distintivas.

En relación a la selección de cepas nativas con actividad a pH 4.0 se destacaron en cuanto a la producción de actividad BGL *Issatchenkia terricola* PV10-69F e *Issatchenkia orientalis* TE11-19F. Ambas cepas presentaron niveles de actividad similares a lo observado previamente para la cepa nativa de referencia *I. terricola* 0621. La caracterización bioquímica y enológica de la BGL de *Issatchenkia orientalis* TE11-19F aportó al conocimiento de una nueva BGL de una cepa nativa de levaduras no-*Saccharomyces*. Sin embargo, el uso de esta enzima inmovilizada en vinos se vio limitada ya que su actividad y estabilidad en este medio fue muy baja. En cambio, la BGL *I. terricola* 0621 fue activa y estable en vinos Moscatel, Tannat y C. sauvignon. A su vez, la enzima de *I. terricola* inmovilizada mostró una marcada actividad sobre precursores tipo norisoprenoides en las tres variedades y específicamente hacia precursores de vomifoliol y 3-oxo- $\alpha$ -ionol. Los resultados de GC-MS se correlacionaron con el estudio sensorial ya que las notas asociadas a estos compuestos (nueces, frutos secos) fueron encontradas por el panel en los vinos tratados enzimáticamente. La importancia de la selectividad de la enzima en el aroma del vino, quedó en evidencia tanto en el análisis de compuestos aromáticos por GC-MS, como en el estudio sensorial, cuando se compararon las notas obtenidas en los vinos tratados con la enzima nativa frente a la preparación comercial.

Una limitante para la explotación de cepas silvestres en la producción de biocatalizadores de interés es que con frecuencia la actividad buscada se produce en bajas cantidades, siendo la optimización de la producción un desafío a abordar. En este sentido, se estudió la influencia de la modificación de las condiciones de cultivo y se determinaron los parámetros estequiométricos de

crecimiento de la levadura *I. terricola* en medio nutriente sintético con glucosa. El escalado posterior en biorreactores permitió incrementar la producción de la BGL. Sin embargo, la aplicación industrial de la enzima depende críticamente de una mayor eficiencia en la producción y requiere el desarrollo de estrategias adicionales tales como clonado y expresión recombinante.

La generación de la cepa de *S. cerevisiae* recombinante que expresa la enzima BGL *I. terricola* abre un abanico de múltiples posibilidades para su estudio y aplicación. Es destacable que los clones recombinantes de *S. cerevisiae* con la secuencia codificante de BGL, expresaron exitosamente actividad BGL a bajos valores de pH, lo que podría viabilizar la producción de mayores niveles de BGL *I. terricola*.

Con esta perspectiva se continuará estudiando los clones de *S. cerevisiae* conteniendo los *cassettes* de expresión de BGL *I. terricola* de manera de seleccionar aquellos que presenten la mejor performance en cuanto a expresión de actividad BGL.

En el caso de la BGL *I. orientalis*, si bien su aplicación en vino presenta posibilidades limitadas, se destaca su actividad frente al sustrato CMC celulosa. Este resultado, sumado a que la enzima es activa en condiciones elevadas de etanol (hasta 40%v/v) sugiere que podría emplearse en otras aplicaciones biotecnológicas como la degradación de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol. Podría entonces plantearse a futuro profundizar en el estudio de esta enzima para esa aplicación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Allured: Carol Steam, IL.
- Ahmed, A., Aslam, M., Ashraf, M., ul-Hassan Nasim, F., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial  $\beta$ -Glucosidases: Screening, Characterization, Cloning and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(2), 57–73. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-2-2>
- Ahmed, A., Nasim, F., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial  $\beta$  - Glucosidase : Sources, Production and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 31–46. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-4>
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J.-L., Goma, G., Molina-Jouve, C., & Guillouet, S.E. (2004). Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 537–542. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1393-5>
- Amberg, D.C., Burke, D., & Strathern, J.N. (2005). Method in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- Andorrà, I., Miró, G., Espligares, N. Mislata, A.M., Puxeu, M., & Ferrer-Gallego, R. (2019). Wild yeast and lactic acid bacteria of wine in Yeasts in Biotechnology. IntechOpen, London
- Arévalo-Villena, M. (2006). Estudio de actividad  $\beta$ -Glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias Químicas, España.
- Arévalo-Villena, M. A., Úbeda-Iranzo, J.F., & Briones-Pérez, A.I. (2007).  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.07.013>
- Arroyo, T., Cordero, G., Serrano, A., & Valero, E. (2010).  $\beta$  -Glucosidase Production By Yeasts Isolated From Vineyard. *Expression of Multidisciplinary Flavour Science*, 359–362.
- Baffi, M. A., Martin, N., Tobal, T. M., Ferrarezi, A. L., Lago, J.H.G., Boscolo, M., Gomes, E., & Da-Silva, R. (2013). Purification and characterization of an ethanol-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7), 1681–1691. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0471-0>
- Bai Flagfeldt, D. B., Siewers, V., Huang, L., & Nielsen, J. (2009).

- Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *26*(10), 545–551. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Bajard Sparrow, C., Fauveau, C., Grassin, C., & Pellerin, P. (2006). Enzimas enológicas; método de producción, modo de acción e impacto sobre la transformación de la uva en vino (DSM Food Specialties). *Revista Internet de Viticultura y Enología*, *12*(1), 1–8.
- Barata, A., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(3), 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P., & Spagna, G. (2007). Characteristic of  $\beta$ -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, *41*(5), 570–575. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.006>
- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R., Restuccia, C., & Giudici, P. (2004). Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, *35*(1), 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.005>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, A., Torres, R., Rodrigues, R.C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, *4*, 1583–1600.
- Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., Høj, P. B., & Pretorius, I. S. (2004). Chasing wine aroma. Does *Oenococcus oeni* have the potential to release aroma compounds from authentic grape precursors?. *Wine Industry Journal*, *19*(2), 24–31.
- Batra, J., Beri, D., & Mishra, S. (2014). Response surface methodology based optimization of  $\beta$ -glucosidase production from *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(1), 380–393. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0519-1>
- Bayonove, C. (1988). Sequential glycosides. *Carbohydrate Research*, *184*, 139–149.
- Belancic, A., & Agosin, E. (2007). Aromas varietales: Influencia de ciertas prácticas vitícolas y enológicas, 1–21. [www.centroaromas.cl](http://www.centroaromas.cl)
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. *Molecules*, *22*(2), 1–29. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
- Berreta Curi, A., Bonfanti, D. Bouret, D., Bentancor, A., & Viera Cherro, M. (2008). Del nacimiento de la vitivinicultura a las organizaciones gremiales: la constitución del Centro de Bodegueros del Uruguay. Ediciones Trilce, Montevideo.



- Bhatia, Y., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2002). Microbial  $\beta$ -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(4), 375–407.
- Bindon, K., Holt, H., Williamson, P.O., Varela, C., Herderich, M., & Francis, I.L. (2014). Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet consumer preference. *Food Chemistry*, 154, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.099>
- Boido, E., Fariña, L., Carrau, F., Dellacassa, E., & Cozzolino, D. (2013). Characterization of Glycosylated Aroma Compounds in Tannat Grapes and Feasibility of the Near Infrared Spectroscopy Application for Their Prediction. *Food Analytical Methods*, 6, 100–111. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9423-5>
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., & Dellacassa, E. (2003). Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: The typical red wine from Uruguay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5408–5413. <https://doi.org/10.1021/jf030087i>
- Boido, E., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., & Dellacassa, E. (2009). The effect of bacterial strain and aging on the secondary volatile metabolites produced during malolactic fermentation of Tannat red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6271–6278. <https://doi.org/10.1021/jf900941y>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes and Cells: A Literature Survey in Methods in Molecular Biology. Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7>
- Brugnari, T., Pereira, M.G., Bubna, G.A., de Freitas, E.N., Contato, A.G., Corrêa, R.C.G., Castoldi, R., de Souza, C.G.M., Polizeli, M.L.T.M., Bracht, A., & Peralta, R.M. (2018). A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. *Science of the Total Environment* 634, 1346–1351.
- Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J., & Günata, Z. (2003). Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 581–587. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00179-0)
- Cairns, J.R.K., & Esen, A. (2010).  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), 3389–3405. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>
- Canal-Llaubères, R.M. (2003). La purificación de preparaciones enzimáticas para la enología. impactos sobre la calidad de vinos tintos y blancos. *Vinidea.net Wine Internet Technical Journal*, 7, 1–7.

- Castañeda, M.T. (2019). Enzimas de interés biotecnológico. Material de la Cátedra de Biotecnología de la Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional La Plata.
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*(1), 233–238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Carrau, F., Gaggero, C., & Aguilar, P.S. (2015). Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends in Biotechnology*, *33*(3), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.009>
- Castillo Rosales, E., & Rodríguez Alegría, M. E. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista Digital Universitaria*, *15*(12), 1607–6079. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96>
- Cazaban, D. (2014). Inmovilización y estabilización de lacasas para su uso en celdas de biocombustibles. Tesina de grado, Facultad de Ingeniería, Universidad ORT.
- Cazaban, D., Illanes, A., Wilson, L., & Betancor, L. (2018). Bio-inspired silica lipase nanobiocatalysts for the synthesis of fatty acid methyl esters. *Process Biochemistry*, *76*, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.004>
- Cazaban, D., Wilson, L., & Betancor, L. (2016). Lipase Immobilization on Siliceous Supports: Application to Synthetic Reactions. *Current Organic Chemistry*, *21*(2), 96–103. <https://doi.org/10.2174/1385272821666161108103040>
- Cha-Aim, K., Hoshida, H., Fukunaga, T., & Akada, R. (2012). Fusion PCR via novel overlap sequences. *Methods in Molecular Biology*, *852*, 97–110. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_8)
- Chen, H., Hayn, M., & Esterbauer, H. (1992). Purification and characterization of two extracellular beta-glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1121*, 54–60. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90336-C](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90336-C)
- Chen, L., Li, N., & Zong, M.H. (2012). A glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, *47*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.023>
- Cho, E.J., Jung, S., Kim, H.J., Lee, Y.G., Nam, K.C., Lee, H.J., & Bae, H.J. (2012). Co-immobilization of three cellulases on Au-doped magnetic silica nanoparticles for the degradation of cellulose. *Chemical Communications*, *48*(6), 886–888. <https://doi.org/10.1039/c2cc16661e>
- Chui, W.K., & Wan, L.S.C. (1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *Journal of Microencapsulation*, *14*(1), 51–61. <https://doi.org/10.3109/02652049709056467>

- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J. A., Oro, L., Rodrigues A.J., & Gonzalez, R. (2016). Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Frontiers in Microbiology*, 4(7), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00642>
- Cid, A.G., Goldner, M.C., Daz, M., & Ellenrieder, G. (2012). The Effect of Endozym  $\beta$ -split, a Commercial Enzyme Preparation Used for Aroma Release, on Tannat Wine Glycosides. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 33(1), 51–57.
- Cioch-Skoneczny, M., Satora, P., Skotniczny, M., & Skoneczny, S. (2018). Quantitative and qualitative composition of yeast microbiota in spontaneously fermented grape musts obtained from cool climate grape varieties Rondo' and Regent'. *FEMS Yeast Research*, 18(8). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy089>
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21(2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7)
- Cooney, C.L., Wang, H.Y., & Wang, D.I.C. (2006). Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(2), 327–332. <https://doi.org/10.1002/bit.21155>
- Cordero Otero, R.R., Ubeda Iranzo, J.F., Briones-Perez, A.I., Potgieter, N., ArévaloVillena, M.A., Pretorius, I.S., & Van Rensburg, P. (2003). Characterization of the  $\beta$ -glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science*, 68(8), 2564–2569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07062.x>
- Corduas, M., Cinquanta, L., & Ievoli, C. (2013). The importance of wine attributes for purchase decisions: A study of Italian consumers' perception. *Food Quality and Preference*, 28(2), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.11.007>
- Cruelles-Borrull, N. (2012). El perfume del vino como poema químico. *Enoviticultura*, 15, 62–65.
- Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D.R., Henrissat, B., & Esen, A. (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in  $\beta$ -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize  $\beta$ -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13555–13560. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.25.13555>
- da Silva, G.A., Bernardi, T.L., Schaker, P.D.C., Menegotto, M., & Valente, P. (2012). Rapid yeast DNA extraction by boiling and freeze-thawing without using chemical reagents and DNA purification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(2), 319–327.

<https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000200020>

- da Silva, R.R., da Conceição, P.J.P., de Menezes, C.L.A., de Oliveira Nascimento, C.E., Machado Bertelli, M., Pessoa Júnior, A., Monteiro de Souza, G., da Silva, R., & Gomes, E. (2019). Biochemical characteristics and potential application of a novel ethanol and glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase secreted by *Pichia guilliermondii* G1.2. *Journal of Biotechnology*, 294, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.02.001>
- Dan, S., Marton, I., Dekel, M., Bravdo, B.A., He, S., Withers, S.G., & Shoseyov, O. (2000). Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4973–4980. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4973>
- Darriet, P., Thibon, C., & Dubourdieu, D. (2012). Aroma and aroma precursors in grape berry. *The Biochemistry of the Grape Berry*, 111–136. <https://doi.org/10.2174/978160805360511201010111>
- Das, S., Berke-Schlessel, D., Ji, H.F., McDonough, J., & Wei, Y. (2011). Enzymatic hydrolysis of biomass with recyclable use of cellobiase enzyme immobilized in sol-gel routed mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(1–2), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.003>
- de Ovalle, S., Brena, B., Fariña, L., & González-Pombo, P. (2016). Novel beta-glucosidase from *Issatchenkia orientalis*: Characterization and assessment for hydrolysis of muscat wine glycosides. *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 174–183.
- de Ovalle, S., Cavello, I., Brena, B. M., Cavalitto, S., & González-Pombo, P. (2018). Production and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.026>
- de Ovalle, S., Brena, B.M., & González-Pombo, P. (2021). Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. *Food Chemistry*, 346, 128899. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128899>
- Delgado, L., Parker, M., Fisk, I., & Paradisi, F. (2020). Performance of the extremophilic enzyme BglA in the hydrolysis of two aroma glucosides in a range of model and real wines and juices. *Food Chemistry*, 323, 126825. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126825>
- Di Gaspero, M., Ruzza, P., Hussain, R., Honisch, C., Biondi, B., Siligardi, G., Marangon, M., Curioni, A., & Vincenzi, S. (2020). The secondary structure of a major wine protein is modified upon interaction with polyphenols. *Molecules*, 25(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules25071646>
- Dong, M., Fan, M., Zhang, Z., Xu, Y., Li, A., Wang, P., & Yang, K. (2014). Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Oenococcus*

- oeni* 31MBR. *European Food Research and Technology*, 239, 995–1001. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2296-7>
- Dourron, J. (2020). Explotación del genoma de *Issatchenkia terricola* para la identificación de glicosidasas con potencial aplicación en enología. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Área Biología, Uruguay.
- Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*, 30, 6–10. <https://doi.org/10.3791/1431>
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines . Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501–4510.
- Escudero, A., & Ferreira, V. (2013). Chemical systems behind wine aroma perception. *Proceedings of the XXIVes entretiens scientifiques LALLEMAND*, 69–71.
- Fajardo-Ochoa, R., Osuna-Castro, J.A., Villa Velázquez-Mendoza, C., Escalante-Minakata, P., & Ibarra-Junquera, V. (2011). Inmovilización De Células Y Enzimas. *Acta Química Mexicana*, 3(6), 42–56.
- Fariña, L., Villar, V., Ares, G., Carrau, F., Dellacassa, E., & Boido, E. (2015). Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. *FRIN*, 69, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.029>
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., & Guisán, J.M. (1993). Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(7), 546–550. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90016-U](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90016-U)
- Fernández Pérez, R. (2015). Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas. Tesis Doctoral, Universidad de la Rioja, España. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=45994>
- Fia, G., Giovani, G., & Rosi, I. (2005). Study of  $\beta$ -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 509–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02657.x>
- Fia, G., Olivier, V., Cavaglioni, A., Canuti, V., & Zanoni, B. (2016). Side activities of commercial enzyme preparations and their influence on the hydroxycinnamic acids, volatile compounds and nitrogenous components of white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(3), 366–375. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12232>
- Fladung, M., Schenk, T.M.H., Polak, O., & Becker, D. (2010). Elimination of marker genes and targeted integration via FLP/FRT recombination

- system from yeast in hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.). *Tree Genetics and Genomes*, 6(2), 205–217. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0241-x>
- Food & Drug Administration, D. (2020). How GMOs Are Regulated for Food and Plant Safety in the United States. <https://www.fda.gov/food/agricultural-biotechnology/how-gmos-are-regulated-food-and-plant-safety-united-states>.
- Francis, I.L., & Newton, J.L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 114–126. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00283.x>
- Francis, I. Leigh, Kassara, S., Noble, A. C., & Williams, P. J. (1998). The Contribution of Glycoside Precursors to Cabernet Sauvignon and Merlot Aroma: Sensory and Compositional Studies. *ACS Symposium Series*, 714, 13–30.
- García Gallego, J. (2008). Maridaje, enología y cata de vinos. IC Editorial, Málaga.
- García-Kirchner, O., Segura-Granados, M., & Rodríguez-Pascual, P. (2005). Effect of media composition and growth conditions on production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* C-6. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 347–359. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_30)
- Garofalo, C., Berbegal, C., Grieco, F., Tufariello, M., Spano, G., & Capozzi, V. (2018). Selection of indigenous yeast strains for the production of sparkling wines from native Apulian grape varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.004>
- Ghosh, P., Pamment, N. B., & Martin, W. R. B. (1982). Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: effect of  $\beta$ -d-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 4(6), 425–430. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90075-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90075-8)
- Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L., & Batista-Viera, F. (1998). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis - B: Enzymatic*, 4, 313–327. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(98\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(98)00071-X)
- Gietz, D., St Jean, A., Robin, J., & Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 20(6), 1992.
- Gietz, R.D., & Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Gil Muñoz, J. (2015). Estudio de las  $\beta$ -glucosidasas del complejo celulítico de *Talaromyces amestolkiae*: caracterización y aplicaciones

- biotecnológicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, España.
- González-Neves, G., Favre, G., Piccardo, D., & Gil, G. (2016). Original article Anthocyanin profile of young red wines of Tannat, Syrah and Merlot made using maceration enzymes and cold soak. *International Journal of Food Science and Technology* 51, 260–267. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12958>
- González-Pombo, P. (2010) Purificación y caracterización de  $\beta$ -glucosidasas de cepas nativas de levadura. Diseño de un biocatalizador inmovilizado para la mejora de la calidad de vinos. Tesis Doctoral. Universidad de la República, Facultad de Química, Uruguay.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., & Brena, B. M. (2011). A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, 46(1), 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J.M., Batista-Viera, F., & Brena, B.M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30(8), 1469–1475. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9708-3>
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., & Brena, B.M. (2014). Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidasas. *Food Chemistry*, 143, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.107>
- Gotor Fernández, V., & Hernáiz Gómez-Dégano, M.J.(2017). Biocatálisis aplicada. Las enzimas como herramientas útiles en síntesis orgánica. *Anales de química la revista de la Real Sociedad Española de Química*, 113(1), 27–35. <http://hdl.handle.net/10651/44399>
- Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E.L., Galán-Wong, L.J., & Viader-Salvadó, J.M. (2004). Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. *Avances en Nutrición Acuicola* 7, 418–440.
- Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J., & Blondin, B. (2007). Molecular Basis of Fructose Utilization by the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 Allele Enhances Fructose Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2432–2439. <https://doi.org/10.1128/AEM.02269-06>
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K.R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology*, 4(1), 1–6. <https://doaj.org/article/69a4997c718d471dbfa19d59d7b01d78>
- Harnpicharnchai, P., Champreda, V., Sornlake, W., & Eurwilaichitr, L. (2009). A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia sp.*, with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification*, 67(2), 61–69.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.05.022>

- Hernández-Díaz, A., & Vargas-García, P. (2016). Sistema de control de alimentación para cultivo lote alimentado exponencial. *Revista de Análisis Cuantitativo y Estadístico*, 3(6), 57–65.
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., & Ferreira, V. (2009). Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Research International*, 42(7), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.023>
- Hewitt, C.J., & Nienow, A.W. (2007). The Scale-Up of Microbial Batch and Fed-Batch Fermentation Processes. *Advances in Applied Microbiology*, 62(7), 105–135. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)62005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)62005-X)
- Hierro, N., González, A., Mas, A., & Guillamán, J.M. (2006). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: Effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research*, 6(1), 102–111. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00014.x>
- Hu, K., Zhu, X. L., Mu, H., Ma, Y., Ullah, N., & Tao, Y.S. (2016). A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: Its application potential in wine aroma enhancement. *Letters in Applied Microbiology*, 62(2), 169–176. <https://doi.org/10.1111/lam.12527>
- Husnik, J.I., Delaquis, P.J., Cliff, M.A., & Van Vuuren, H.J.J. (2007). Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 42–52.
- Ikram-ul-Haq, Javed, M.M., Siddiq, Z., & Saleem, T. (2006). Triggering of  $\beta$ -glucosidase Production in *Trichoderma viride* with Nutritional and Environmental Control. *Journal of Applied Sciences Research* 2(11), 884–889.
- Iland, P.G., Cynkar, W., Francis, I.L., Williams, P.J., & Coombe, B.C.G. (1995). Optimisation of methods for the determination of total and red-free glycosyl glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2(3), 171–178. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1996.tb00105.x>
- Ilc, T., Werck-Reichhart, D., & Navrot, N. (2016). Meta-analysis of the core aroma components of grape and wine aroma. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01472>
- Illanes, A. (1999). Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.2225/vol2-issue1-fulltext-2>
- Illanes, A. (2008). Chemoselective transesterification of wood sterols by lipases. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17–35.
- INEGI. (2018). Estadísticas de Viñedos-Datos Nacionales. Instituto Nacional de Vitivinicultura, 1–10. [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/bosques2016\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/bosques2016_0.pdf)



- Isono, N., Hayakawa, H., Usami, A., Mishima, T., & Hisamatsu, M. (2012). A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *113*(1), 76–78. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.004>
- Jackson, E., Ferrari, M., Cuestas-Ayllon, C., Fernández-Pacheco, R., Perez-Carvajal, J., De La Fuente, J.M., Grazú, V., & Betancor, L. (2015). Protein-templated biomimetic silica nanoparticles. *Langmuir*, *31*(12), 3687–3695. <https://doi.org/10.1021/la504978r>
- Jackson, R.S. (2014). *Chemical Constituents of Grapes and Wine in Wine Science* (Fourth edition). Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381468-5.00006-3>
- Jeya, M., Joo, A.R., Lee, K.M., Tiwari, M.K., Lee, K.M., Kim, S.H., & Lee, J.K. (2010). Characterization of  $\beta$ -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(5), 1473–1484. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2395-8>
- Ji, P., Tan, H., Xu, X. & Feng, W. (2012). Lipase Covalently Attached to Multiwalled Carbon Nanotubes as an Efficient Catalyst in Organic Solvent. *AIChE Journal*, *59*(4), 215–228. <https://doi.org/10.1002/aic>
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., & Pretorius, I.S. (2006). The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *South African Journal for Enology and Viticulture*, *27*(1), 15–39.
- Juhasz, T., Egyhazy, A. & Réczey, K. (2005).  $\beta$ -Glucosidase Production by *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *121*(1), 243–254.
- Kalyani, D., Lee, K.M., Tiwari, M.K., Ramachandran, P., Kim, H., Kim, I.W., Jeya, M., & Lee, J.K. (2012). Characterization of a recombinant aryl  $\beta$ -glucosidase from *Neosartorya fischeri* NRRL181. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(2), 413–423. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3631-6>
- Karaffa, L., Fekete, E., Gamauf, C., Szentirmai, A., Kubicek, C.P., & Seiboth, B. (2006). D-galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology*, *152*(5), 1507–1514. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28719-0>
- Karkehabadi, S., Helmich, K.E., Kaper, T., Hansson, H., Mikkelsen, N.E., Gudmundsson, M., Piens, K., Furdala, M., Banerjee, G., Scott-Craig, J.S., Walton, J.D., Phillips, G.N., & Sandgren, M. (2014). Biochemical characterization and crystal structures of a fungal family 3  $\beta$ -glucosidase, Cel3A from *Hypocrea jecorina*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(45), 31624–31637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587766>
- Kassemeyer, H.H. (2017). Fungi of grapes in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, New York. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_4)

- Kim, D.H., Hong, Y.A., & Park, H.D. (2008). Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters*, *30*(9), 1633–1638. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9726-1>
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J.M., & Nevoigt, E. (2017). Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental Microbiology*, *19*(3), 878–893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13617>
- Kodama, S., Nakanishi, H., Thalagala, T.A.T.P., Isono, N., & Hisamatsu, M. (2013). A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *115*(5), 557–561. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.006>
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., & Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, *21*(4), 377–397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Kowalandrobertg, R., & Frederick, N.C. (1980). Stabilization of Proteins Immobilized Glutaraldehyde on Sepharose Crosslinking from Leakage by Glutaraldehyde Crosslinking. *Analytical Biochemistry*, *102*, 72–76.
- Krisch, J., Takó, M., Papp, T., & Vágvölgyi, C. (2010). Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from *Zygomycetes*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 891–896.
- Kröger, N., Dubey, N. C., & Kumari, E. (n.d.). Immobilization of Proteins on Diatom Biosilica in Diatom Nanotechnology: Progress and Emerging Applications. RSC Publishing, Cambridge.
- Kudo, K., Watanabe, A., Ujiie, S., Shintani, T., & Gomi, K. (2015). Purification and enzymatic characterization of secretory glycoside hydrolase family 3 (GH3) aryl  $\beta$ -glucosidases screened from *Aspergillus oryzae* genome. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(6), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.019>
- Kurtzman, C. P., Fell, J.W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. The Yeasts (Vol. 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Laboratories Bio-Rad. (2012). A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. *Manuales Bio-Rad*, 1–92.
- Lamuela-Raventós R.M., & Andres-lacueva, C. (2004). El vino en la dieta mediterránea. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *54*, 79–82.
- Li, B., Chen, Y., Chen, X., Liu, D., Niu, H., Xiong, J., Wu, J., Xie, J., Bai, J., & Ying, H. (2012). A novel immobilization method for nuclease P 1 on macroporous absorbent resin with glutaraldehyde cross-linking and determination of its properties. *Process Biochemistry*, *47*(4), 665–670. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.008>

- Li, S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J., Yan, B., Han, B., & Reeves, M. (2010). International Journal of Food Microbiology Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, *138*(1–2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.009>
- Li, X., Xia, W., Bai, Y., Ma, R., Yang, H., Luo, H., & Shi, P. (2018). A Novel Thermostable GH3  $\beta$ -Glucosidase from *Talaromyce leycettanus* with Broad Substrate Specificity and Significant Soybean Isoflavone Glycosides-Hydrolyzing Capability. *BioMed Research International*, *2018*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/4794690>
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, *56*(3), 658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- Liu, J., Zhu, X., Ullah, N., & Tao, Y. (2017). Aroma Glycosides in Grapes and Wine. *Journal of Food Science*, *82*(2), 248–259. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13598>
- Lopez, B.L., & Quimicas, P.D. (2007). Immobilization of lactase in silica with controlled porosity. *Enzyme*, *13*(36), 103–106.
- López, M.C.L., Mateo J.J., & Maicas, S. (2015). Activities in Four Non-Saccharomyces Yeast Isolates. *Food Chemistry*, *80*(8). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12954>
- López-Gallego, F., M. Guisan, J., & Betancor, L. (2013). Glutaraldehyde-Mediated Protein Immobilization in Immobilization of Enzymes and Cells (Third Edition). Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7>
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chemistry*, *120*(1), 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>
- Machida, M., Ohtsuki, I., Fukui, S., & Yamashita, I. (1988). Nucleotide sequences of *Saccharomycopsis fibuligera* genes for extracellular  $\beta$ -glucosidases as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *54*(12), 3147–3155.
- Mahadevan, P.R., & Eberhart, B. (1964). The  $\beta$ -glucosidase system of *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *108*(1), 30–35. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90351-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(64)90351-0)
- Maicas, S., & Mateo, J.J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *67*(3), 322–335. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1806-0>
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P.A. (2012). Hydrolysis and formation of volatile esters in New Zealand Sauvignon blanc wine. *Food Chemistry*, *135*(2), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.034>

- Malherbe, D., du Toit, M., Cordero-Otero, R.R., Van Rensburg, P., & Pretorius, I.S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, *61*, 502–511 <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1208-0>
- Manzanares, P., Orejas, M., Vicente Gil, J., de Graaff, L.H., Visser, J., & Ramón, D. (2003). Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA Gene, Encoding an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of Enological Interest. *Microbiology*, *69*(12), 7558–7562. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7558>
- Martos, M.A. (2011). Unidad temática IV Modo de operación de biorreactores. Universidad Nacional de Misiones, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Editorial Universitaria.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*, 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mateo, J.J., & Andreu, L. (2020). Characterization of an exocellular ethanol-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Quambalaria cyanescens* isolates from unripened grapes. *European Food Research and Technology*, *246*(11), 2349–2357. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03578-w>
- Mateo, J.J., & Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, *881*(1–2), 557–567. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01342-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01342-4)
- Mateo, J.J., Peris, L., Ibañez, C., & Maicas, S. (2011). Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(2), 347–354. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0780-z>
- Mathieu, S., Wirth, J., Sauvage, F.-X., Lepoutre, J.-P., Baumes R., & Gunata, Z. (2009). Biotransformation of C13-norisoprenoids and monoterpenes by a cell suspension culture of cv. Gamay (*Vitis vinifera*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *97*, 203–213. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9516-z>
- Maturano, P., Assof, M., & Nally, C. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures : relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek*, *108*, 1239–1259. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0578-0>
- Mazzaferro, L.S., & Breccia, J.D. (2011). Functional and biotechnological insights into diglycosidases. *Biocatalysis and Biotransformation*, *29*(4), 103–112. <https://doi.org/10.3109/10242422.2011.594882>
- Mccarter, J.D., & Withers, S.G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, *4*, 885–892.
- McLafferty, F.W.; & Stauffer D.B. (1989). The Wiley/NBS Registry of Mass

Spectral Data, Fifth Edition. Wiley: New York.

- Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the — norisoprenoids — in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *483*(2), 236–245.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>
- Mendonça, L.M.F., & Marana, S.R. (2011). Single mutations outside the active site affect the substrate specificity in a  $\beta$ -glycosidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1814*(12), 1616–1623.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.012>
- Mesas, J.M., Rodríguez M.C., & Alegre, M.T. (2011). Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Letters in Applied Microbiology*, *52*, 258–268.  
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02991.x>
- Michlmayr, H., & Kneifel, W. (2014).  $\beta$ -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS microbiology letters*, *352*(1): 1-10. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12348>
- Michlmayr, H., Nauer, S., Brandes, W., Schümann, C., Kulbe, K.D., Andrés, M., & Eder, R. (2012). Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*, *135*(1), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.099>
- Michlmayr, H., Schümann, C., Wurbs, P., da Silva, N.M.B.B., Rogl, V., Kulbe, K.D., & del Hierro, A.M. (2010). A  $\beta$ -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: Cloning and expression in *E. coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(7), 1281–1289. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0299-5>
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., & Waldron, K.C. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, *37*(5), 790–802. <https://doi.org/10.2144/3705A0790>
- Mohamad, N.R., Haziqah, N., Marzuki, C., Buang, N.A., & Wahab, R.A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *29*(2), 205–220.  
<https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., & Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(9), 3993–4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Moreno-Arribas, M., & Polo, M. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Springer: New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Morgan, H.H., du Toit, M., & Setati, M.E. (2017). The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing.

- Frontiers in Microbiology*, 8, 1–15.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00820>
- Nooney, R.I., Thirunavukkarasu, D., Yimei, C., Josephs, R., & Ostafin, A.E. (2002). Synthesis of nanoscale mesoporous silica spheres with controlled particle size. *Chemistry of Materials*, 14(11), 4721–4728.  
<https://doi.org/10.1021/cm0204371>
- Oberholster, A., Elmendorf, B.L., Lerno, L.A., King, E.S., Heymann, H., Brenneman, C.E., & Boulton, R.B. (2015). Barrel maturation, oak alternatives and micro-oxygenation: Influence on red wine aging and quality. *Food Chemistry*, 173, 1250–1258.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.043>
- Obom, K.M., Magno, A., & Cummings, P.J. (2013). Operation of a Benchtop Bioreactor. *Journal of Visualized Experiments*, 79, 1–6.  
<https://doi.org/10.3791/50582>
- Olguín, N., Alegret, J.O., Bordons, A., & Reguant, C. (2011).  $\beta$ -glucosidase activity and bgl gene expression of *Oenococcus oeni* strains in model media and Cabernet Sauvignon wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(1), 99–105. <https://doi.org/10.5344/ajev.2010.10044>
- Oliveira, J.M., Oliveira, P., Baumes, R.L., & Maia, M.O. (1998). Volatile and Glycosidically Bound Composition of Loureiro and Alvarinho Wines. *Food Science and Technology International*, 14(4), 341–353.  
<https://doi.org/10.1177/1082013208097442>
- Ottone, C., Romero, O., Aburto, C., Illanes, A., & Wilson, L. (2020). Biocatalysis in the winemaking industry: Challenges and opportunities for immobilized enzymes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 595–621. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12538>
- Oyekola, O.O., Ngesi, N., & Whiteley, C.G. (2007). Isolation, purification and characterisation of an endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.020>
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., & Câmara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.017>
- Palmeri, R., & Spagna, G. (2007).  $\beta$ -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 382–389. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.07.007
- Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S., Ramírez, O.T. (2006). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods in Molecular Biology*, 267:15-52. doi: 10.1385/1-59259-774-2:015. PMID: 15269414.
- Park, A.R., Hong, J.H., Kim, J.J., & Yoon, J.J. (2012). Biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from rotten citrus peel. *Mycobiology*, 40(3), 173–180. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.3.173>

- Parker, M., Osidacz, P., Baldock, G.A., Hayasaka, Y., Black, C.A., Pardon, K.H., Jeffery, D.W., Geue, J.P., Herderich, M.J., & Francis, I.L. (2012). Contribution of several volatile phenols and their glycoconjugates to smoke-related sensory properties of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(10), 2629–2637. <https://doi.org/10.1021/jf2040548>
- Partow, S., Siewers, V., Bjørn, S., Nielsen, J., & Maury, J. (2008). Characterization of different promoters for designing a new expression vector in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *27*, 955–964. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Pedroche, J., del Mar Yust, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M., Millán, F. (2007). Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, *40*(5), 1160–1166. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.023>
- Pei, X., Zhao, J., Cai, P., Sun, W., Ren, J., Wu, Q., Zhang, S., Tian, C. (2016). Heterologous expression of a GH3  $\beta$ -glucosidase from *Neurospora crassa* in *Pichia pastoris* with high purity and its application in the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides. *Protein Expression and Purification*, *119*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.11.010>
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify  $\beta$ -glucosidase activity in native wine yeast strains: Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0425-4>
- Pham, P.V. (2000). *Medical Biotechnology: Techniques and Applications in Omics Technologies and Bio-Engineering*. Elsevier, Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>
- Piqueras, J. (2014). *La vid y el vino en España: Edades Antigua y Media*. U.Valencia: Valencia.
- Plessis, H.W., du Toit, M., Hoff, J. W., Hart, R.S., Ndimba, B.K., & Jolly, N.P. (2017). Characterisation of Non- *Saccharomyces* Yeasts Using Different Methodologies and Evaluation of their Compatibility with Malolactic Fermentation. *South African Journal for Enology and Viticulture*, *38*(1), 46–63.
- Poddar, A., & Chandra Jana, S. (2011). Immobilization of hyperthermostable  $\beta$  amylase from *Bacillus subtilis* DJ5 into gelatin film by glutaraldehyde crosslinking. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *2*(4), 77–86.
- Pogorzelski, E., & Wilkowska, A. (2007). Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour and Fragrance Journal*, *22*, 206–213. <https://doi.org/10.1002/ffj>

- Pretorius, I.S., Curtin, C.D., & Chambers, P.J. (2012). The Winemaker's bug: From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. *Bioengineered Bugs*, 3(3), 147–156. <https://doi.org/10.4161/bbug.19687>
- Puig, S., Ramón, D., & Pérez-Ortín, J.E. (1998). Optimized Method To Obtain Stable Food-Safe Recombinant Wine Yeast Strains, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 1689–1693.
- Quatrini, P., Marineo, S., Puglia, A.M., Restuccia, C., Caggia, C., Randazzo, C.L., Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., & Giudici, P. (2008). Partial sequencing of the  $\beta$ -glucosidase-encoding gene of yeast strains isolated from musts and wines. *Annals of Microbiology*, 58(3), 503–508. <https://doi.org/10.1007/BF03175549>
- Riaz, A., Ul Qader, S.A., Anwar, A., & Iqbal, S. (2009). Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase on calcium alginate beads from *Bacillus subtilis*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(3), 2883–2887.
- Ribéreau-Gayon, P. & Stonestreet, E. (1965) Determination of Anthocyanins in Red Wine. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 9, 2649-2652.
- Robinson, J. (2006). *The Oxford Companion to Wine* (Third edition). Oxford University Press: Oxford.
- Rodríguez-Bencomo, J.J., Selli, S., Muñoz-González, C., Martín-Álvarez, P.J., & Pozo-Bayón, M.A. (2013). Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wines. *FRIN*, 51(2), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.057>
- Rodríguez, S., & Toca-Herrera, J.L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25, 558–569 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.002>
- Romano, P., Ciani, M., & Fleet, G.H. (2015.). *Yeasts in the Production of Wine*. Springer: New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4>
- Sacks, G.L., Gates, M.J., Ferry, F.X., Lavin, E.H., Kurtz, A.J., & Acree, T.E. (2012). Sensory threshold of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) and concentrations in young Riesling and non-Riesling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 2998–3004. <https://doi.org/10.1021/jf205203b>
- Salinas, M. R., Serrano de la Hoz, K., Zalacain, A., Lara, J.F., & Garde-Cerdán, T. (2012). Talanta Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification. *Talanta*, 89, 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.050>
- Sánchez Palomo, E., Díaz-Maroto Hidalgo M.C., González-Viñas M.A., Pérez-Coello, M.S. (2005). Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chemistry* 92, 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.025>
- Sarry, J. & Gunata, Z. (2004). Food Chemistry Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chemistry*, 87, 509–521.



<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.003>

- Schneider, R., Razungles, A., Augier, C., & Baumes, R. (2001). Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines. *Journal of Chromatography A*, *936*, 145–157.
- Sefton, M.A., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., & Taylor, D.K. (2011). Occurrence, sensory impact, formation, and fate of damascenone in grapes, wines, and other foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(18), 9717–9746.  
<https://doi.org/10.1021/jf201450q>
- Serrano de la Hoz, K. (2014). Determinación de precursores aromáticos glicosídicos de uvas, mostos y vinos, blancos y tintos. Aplicación en bodega. Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha, España.
- Shehata, M. (2017). Immobilization of an alcohol dehydrogenase from *Bacillus thuringiensis* Serovar *israelnesis* on Eupergit C 250 L. Tesis de Master, Gebze Teknik Üniversitesi, Turquía.
- Shi, W., Wang, J., Chen, F., & Zhang, X. (2019). Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, *116*, 108477.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108477>
- Singh, G., Verma, A.K., & Kumar, V. (2016). Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *127*, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Smit, A., Cordero-otero, R.R., Lambrechts, M., & Pretorius, I.S. (2003). Enhancing Volatile Phenol Concentrations in Wine by Expressing Various Phenolic Acid Decarboxylase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 4909–4915.  
<https://doi.org/10.1021/jf026224d>
- Song, X., Jiang, Z., Li, L., & Wu, H. (2014). Immobilization of  $\beta$ -glucuronidase in lysozyme-induced biosilica particles to improve its stability. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, *8*(3), 353–361.  
<https://doi.org/10.1007/s11705-014-1421-2>
- Souza, M., Vanderlei, C., Prazeres, R., Furriel, M., Masui, D.C., & Leone, F.A. (2010). Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, *45*, 272–278.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.018>
- Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., & Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by

- non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91(1) 182–190.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F.F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E., & Vichitphan, K. (2009). The characterisation of a novel *Pichia anomala*  $\beta$ -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. *Annals of Microbiology*, 59(2), 335–343.
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E., & Vichitphan, K. (2011). Characterization of  $\beta$ -glucosidases from *Hanseniaspora sp.* and *Pichia anomala* with potentially aroma-enhancing capabilities in juice and wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 423–430. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0474-8>
- Thiry, M., Cingolani, D., & Thiry, M. (2002). Optimizing scale-up fermentation processes. *TRENDS in Biotechnology*, 20(3), 103–105.
- Tobergte, D.R., & Curtis, S. (2013). GRAS notification for the use of a modified yeast for reduction of ethyl carbamate in fermented beverages. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Tortajada-Serra, M.T. (2012). Process development for the obtention and use of recombinant glycosidases: expression, modelling and immobilisation. Tesis Doctoral, Universitat de Valencia, España.
- Tortajada, M., Martínez-Culebras, P.V., Navarro, V., Monzó, H., & Ramón, D. (2009). Evaluation of DNA extraction methods for pcr detection of fungal and bacterial contamination in cocoa extracts. *European Food Research and Technology*, 230(1), 79–87. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1139-4>
- Tribolo, S., Berrin, J.G., Kroon, P.A., Czjzek, M., & Juge, N. (2007). The Crystal Structure of Human Cytosolic  $\beta$ -Glucosidase Unravels the Substrate Aglycone Specificity of a Family 1 Glycoside Hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 370(5), 964–975. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.034>
- Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshida, M., & Samejima, M. (2006). Molecular cloning and characterization of two intracellular  $\beta$ -glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(4), 807–814. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0526-z>
- Uchima, C.A., Tokuda, G., Watanabe, H., Kitamoto, K., & Arioka, M. (2012). Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of an endogenous thermostable and high-glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from the termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4288–4293. <https://doi.org/10.1128/AEM.07718-11>

- Ugliano, M. (2009). *Enzymes in Winemaking in Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Ugliano, M., & Henschke P.A. (2009). *Yeasts and Wine Flavour in Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York. [Springer.https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5)
- Uruguay XXI. (2015). Sector Vitivinícola, INAVI, 1–10.
- Van Rensburg, P., Strauss, M.L.A., Lambrechts, M.G., Cordero-Otero, R.R., & Pretorius, I.S. (2007). The heterologous expression of polysaccharidase-encoding genes with oenological relevance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, *103*, 2248–2257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03474.x>
- Varavinit, S., Chaokasem, N., & Shobsngob, S. (2002). Immobilization of a thermostable alpha-amylase. *ScienceAsia*, *28*(3), 247–251. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.247>
- Vasella, A., Davies, G.J., & Böhm, M. (2002). Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, *6*(5), 619–629. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00380-0](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00380-0)
- Vazquez-Ortega, P.G., Alcaraz-fructuoso, M. T., Rojas-contreras, J.A., López-miranda, J., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Enzyme and Microbial Technology Stabilization of dimeric  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, *110*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.007>
- Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., & Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*, *25*(6), 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.015>
- Vivier, M.A., & Pretorius, I.S. (2002). Genetically tailored grapevines for the wine industry. *TRENDS in Biotechnology*, *20*(11), 472–478.
- Wang, Y., Kang, W., Xu, Y., Li, J., & Brew, J.I. (2011). Effect of Different Indigenous Yeast  $\beta$ -Glucosidases on the Liberation of Bound Aroma Compounds. *Journal of the Institute of Brewing*, *117*, 230–237
- Wang, Y., Zhang, C., Li, J., & Xu, Y. (2013). Different influences of  $\beta$ -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. *Food Chemistry*, *140*(1–2), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.044>
- Woolfit, M., Rozpedowska, E., Pisku, J., & Wolfe, K.H. (2007). Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast, *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukarotic Cell* *6*(4), 721–733. <https://doi.org/10.1128/EC.00338-06>
- Wu, S., Mou, C., & Lin, H. (2013). Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, *42*, 3862–3875.

<https://doi.org/10.1039/c3cs35405a>

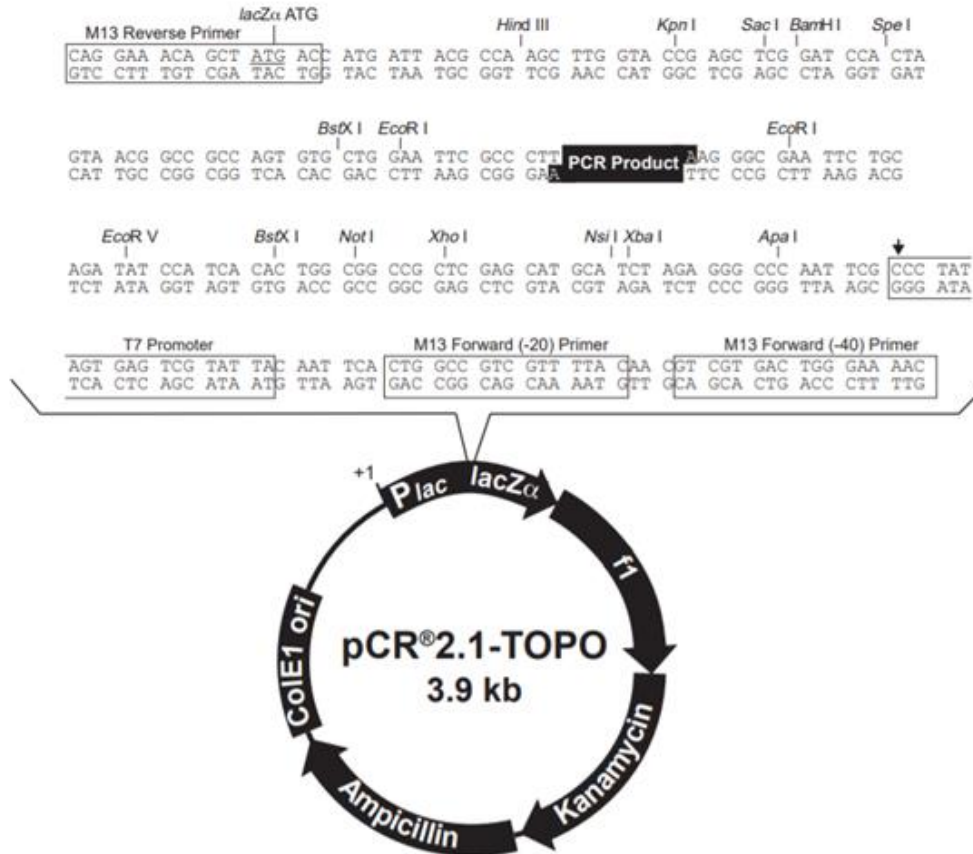
- Xiao, H., Shao, Z., Jiang, Y., Dole, S., & Zhao, H. (2014). Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0121-4>
- Zhou, Q., Xu, J., Kou, Y., Lv, X., Zhang, X., Zhao, G., Zhang, W., Chen, G., & Liu, W. (2012). Differential involvement of  $\beta$ -glucosidases from *Hypocrea jecorina* in rapid induction of cellulase genes by cellulose and cellobiose. *Eukaryotic Cell*, *11*(11), 1371–1381. <https://doi.org/10.1128/EC.00170-12>
- Zunino, F. (2001). La vitivinicultura en el Uruguay. *Presentación de Regiones*, 16–20.

## 7. PUBLICACIONES

- **Novel beta-glucosidase from *Issatchenkia orientalis*: Characterization and assessment for hydrolysis of muscat wine glycosides (2016).** *Global Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(3), 174-183.  
Stefani de Ovalle, Beatriz M. Brena, Laura Fariña, Paula González-Pombo.
  
- **Production and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine (2018).** *LWT Food Science and Technology*, 87 515-522.  
Stefani de Ovalle, Ivana Cavello, Beatriz M. Brena, Sebastian Cavalitto, Paula González-Pombo.
  
- **Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines (2021).** *Food Chemistry*, 346 128899.  
Stefani de Ovalle, Beatriz M. Brena, Paula González-Pombo

## 8. ANEXO

### Vectores para el clonado de productos de PCR



**Figura A-1.** Mapa del vector Topo TA (Thermo Scientific) utilizado para el clonado de productos de PCR obtenidos mediante el uso de oligos degenerados.

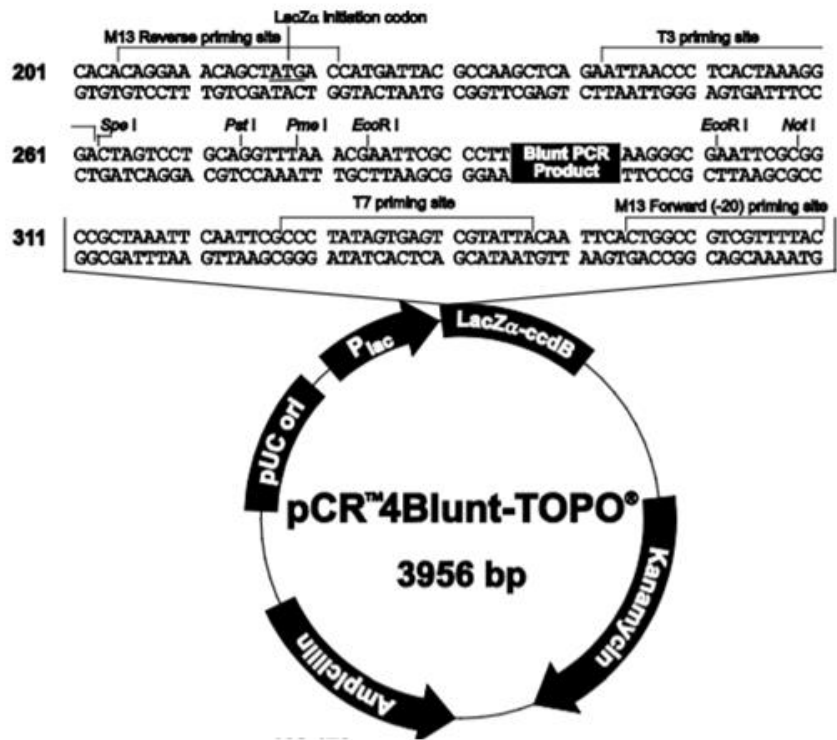
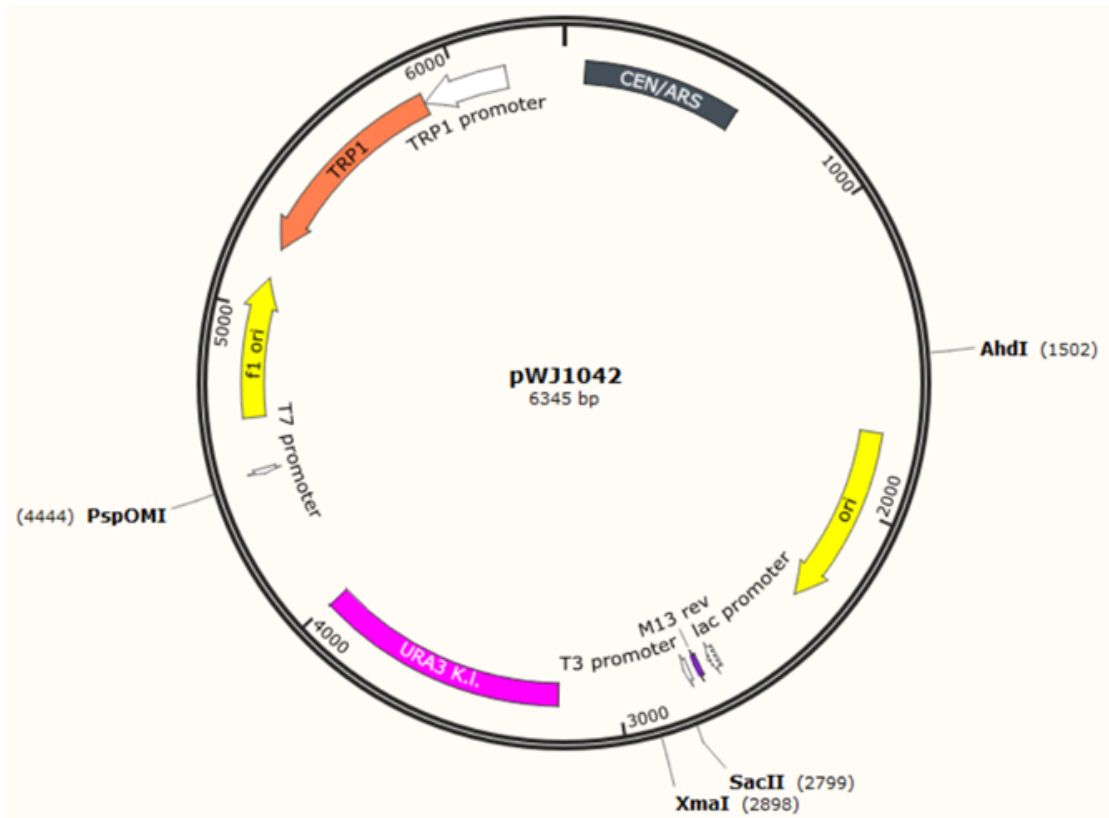


Figura A-2. Mapa del vector Zero blunt (Thermo Scientific) utilizado para el clonado de la secuencia de la BGL *I. terricola*.

## Vectores para clonado de productos de fusión



**Figura A-3.** Mapa del vector pWJ1042 utilizado para el clonado de productos de fusión y la generación de los *cassettes* de expresión.



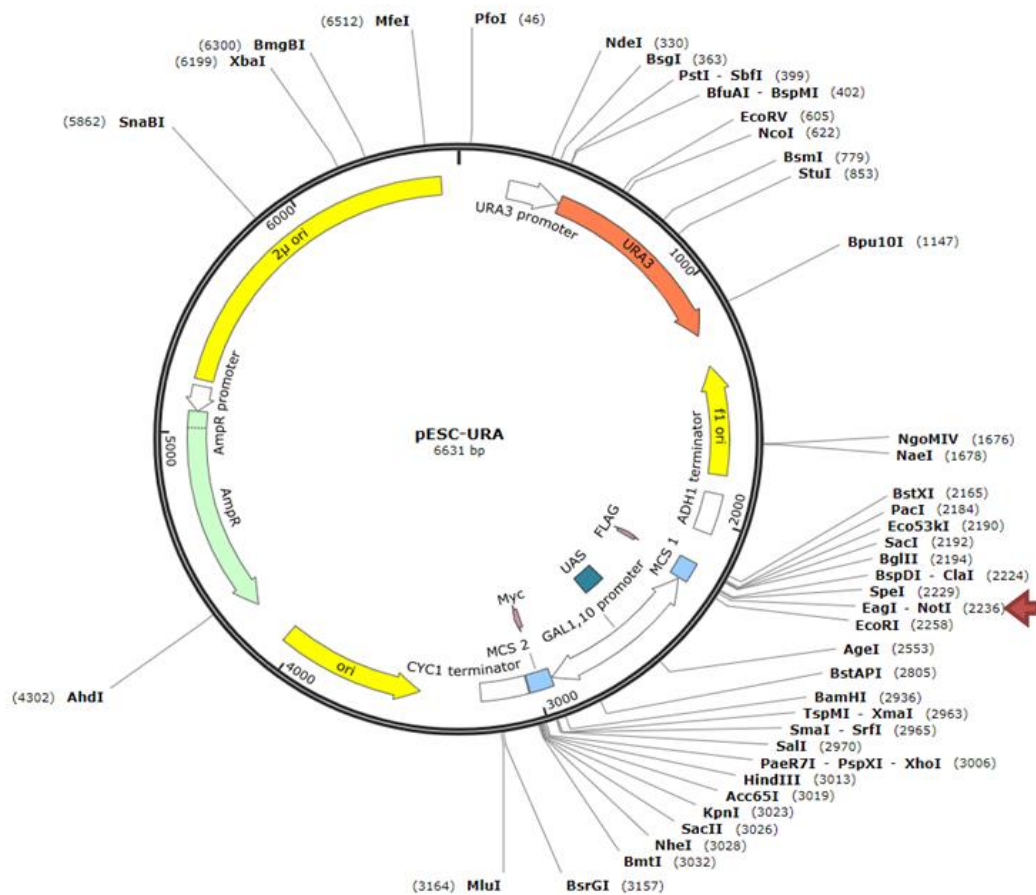


Figura A-4. Mapa del vector pESC-URA utilizado para el clonado de productos de fusión y la transformación de *S. cerevisiae* T73-4. Se indica con una flecha roja el sitio de corte de NotI

## Secuencias

### Secuencia aminoacídica de BGL >g4180 de *I. terricola*

MKLSTFISLFSLISLASTAPVKLQKKNSRWDYESEKIYGVNIGGWLVLEPYIVPSLFEAF  
 GGEDSTKPVDEYHFSATYGKEKAEVQLQHWSTFYTEEDFQLMAEYGLNFVRIPIGY  
 WAFQLLDTPYVQGGQVEYLEKALGWCQKYGLKAWVDLHGVPGSQNGFDNSGLR  
 DVYEWQSNWYQTVTYSVLGEIAQKYSASEYNDVVIGIELVNEPLGPILNDELKEYY  
 NNGYEIVRKEGDVPVIIHDAFLQLTHYWDDVLNTEIDPNVWDVILDHHHYQIFSVPE  
 LSRTIDEHVNYACYLGTEEAEEYHTDLCGEWTAALDTCGKWVNLGLGARWDATY  
 DNSTPLGTCDNLVADYAYFQNEVDVRSTYRRYVEAQMDAYMNKKMSGWVFWCW  
 KTENLIEWDFKQLISLNIIPQLSAREYPNQCYS\*

### Secuencia codificante de BGL >g4180 de *I. terricola*

>g4180.t1 CDS=1-1290

ATGAAATTATCCACATTCATTTCACTGTTTTCTCTAATCTCCTTAGCATCGACTGCTCC  
 TGTGAAACTGCAAAAGAAAAATTCCAGATGGGATTATGAATCCGAAAAGATATATG  
 GTGTCAACATCGGTGGTTGGTTGGTTTTGGAGCCATACATTGTTCCATCTTTGTTT  
 GAAGCCTTTGGTGGAGAAGACTCTACCAAACCAGTAGATGAGTATCATTTTTTCAG  
 CAACATACGGTAAAGAAAAAGCCGAGGAAGTTCTTCAGCAGCATTGGTCTACTTT  
 CTATACAGAAGAAGACTTTCAATTAATGGCTGAATATGGTCTCAATTTTGTTAGAAT  
 TCCAATTGGTTACTGGGCCTTCCAATTAATGGACACAGACCCTTATGTCCAAGGTC  
 AAGTGGAGTATCTGGAAAAAGCCCTTGGATGGTGTCAAAAATACGGATTGAAAGC  
 ATGGGTTGATCTACATGGTGTTCAGGTTCTCAAATGGGTTTCGACAATTCGGTT  
 TGCGTGACGTATATGAGTGGCAATCCAACGAATGGTACCAAACAGTTACCTACTCT  
 GTTCTTGGTCAAATTGCGCAAAAATACTCTGCTTCAGAATATAACGACGTTGTTATT  
 GGAATTGAATTGGTCAATGAACCGCTGGGTCCAATTTTGAACGATACAGAACTGA  
 AGGAATATTATAACAATGGTTATGAAATTGTTAGAAAGGAAGGTGATGTTCCCTGTC  
 ATCATCCACGATGCCTTTTTACAACACTGACTCATTACTGGGATGATGTGCTCAATACC  
 GAGATTGATCCAAATGTATGGGATGTTATTCTTGATCACCACCACTACCAGATTTTC  
 TCCGTTCCCTGAGTTGAGTAGGACTATTGATGAACACGTCAACTATGCATGTTATCTA  
 GGTACTGAAGAAGCTGAAGAGTATCATACTGATCTTTGCGGTGAGTGGACTGCGG  
 CCTTGACTGATTGCGGCAAATGGGTCAATGGTTTGGGTTTAGGCGCAAGATGGGA  
 CGCTACTTACGATAACTCGACTCCGCTGGGTACGTGTGATAATTTGTACGTGGCAG  
 ACTATGCTTACTTCCAGAACGAGGATGTGCGTTCAACTTACAGAAGATACGTAGAA  
 GCACAAATGGACGCATATATGAATAAAAAGATGTCCGGCTGGGTGTTTTGGTGTG  
 GAAACTGAGAATTTGATTGAATGGGATTTCAAGCAGTTAATCTCACTCAACATCA  
 TTCCACAGCCATTGAGTGCAAGAGAGTATCCTAACCAATGTGGCTATGATTCTTAG

**Secuencia nucleotídica de producto de fusión ADHp::BGL::CYCt. Se indican el promotor (en azul), la secuencia de BGL (en rojo) y el terminador (en verde)**

AGGGGGATCGAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGGAAATCAAGGAGCATGAAGGCAAAA  
GACAAATATAAGGGTCGAACGAAAAATAAAGTGAAAAGTGTTGATATGATGTATTTGGC  
TTTGCGGCGCCGAAAAAACGAGTTTACGCAATTGCACAATCATGCTGACTCTGTGGCGG  
ACCCGCGCTCTTGCCGGCCCGGCGATAACGCTGGGCGTGAGGCTGTGCCCGGCGGAGTT  
TTTTGCGCCTGCATTTTTCCAAGGTTTACCCTGCGCTAAGGGGCGAGATTGGAGAAGCAA  
TAAGAATGCCGGTTGGGGTTGCGATGATGACGACCACGACAACCTGGTGTCAATTATTTAA  
GTTGCCGAAAGAACCTGAGTGCATTTGCAACATGAGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGA  
CTTGCGAGACGCGAGTTTGCCGGTGGTGCGAACAATAGAGCGACCATGACCTTGAAGGT  
GAGACGCGCATAACCGCTAGAGTACTTTGAAGAGGAAACAGCAATAGGGTTGCTACCAG  
TATAAATAGACAGGTACATAACAACACTGGAAATGGTTGTCTGTTTGAGTACGCTTTCAA  
TTCATTTGGGTGTGCACTTTATTATGTTACAATATGGAAGGGAACCTTACACTTCTCCT  
ATGCACATATATTAATTAAAGTCCAATGCTAGTAGAGAAGGGGGTAACACCCCTCCGC  
GCTCTTTTCCGATTTTTTCTAAACCGTGGAAATATTCGGATATCCTTTTGTGTTC  
GGGTGTACAATATGGACTTCCTCTTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCCTA  
TAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAAC  
AGATACCAGACAAGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATTG  
ATGGTGGTACATAACGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCG  
AAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAAC  
TTCTTTTCTTTTTTTTTCTTTTCTCTCTCCCCGTTGTTGTCTCACCATATCCGCAATG  
ACAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAATTAACGACAAAGACAGCACCAACAG  
ATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAAACTTTTTCTTCC  
TTCATTCACGCACACTACTCTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCTTCCAGTTACT  
TGAATTTGAAATAAAAAAAGTTTGCTGTCTTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAAT  
TATTAATCTTTTGTTCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTTTCTTCTTGTTCCTTTTC  
TGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCAACTATCTCATATACAATGAAATT  
ATCCACATTCATTTCACTGTTTTCTCTAATCTCCTTAGCATCGACTGCTCCTGTGAAAC  
TGCAAAAGAAAAATTCCAGATGGGATTATGAATCCGAAAAGATATATGGTGTCAACATC  
GGTGGTTGGTTGGTTTTGGAGCCATACATTGTTCCATCTTTGTTTGAAGCCTTTGGTGG  
AGAAGACTCTACCAAACAGTAGATGAGTATCATTTTTTCAGCAACATACGGTAAAGAAA  
AAGCCGAGGAAGTTCTTCAGCAGCATTTGGTCTACTTTCTATACAGAAGAAGACTTTCAA  
TTAATGGCTGAATATGGTCTCAATTTTGTTAGAATCCAATTGGTTACTGGGCCTTCCA  
ATTACTGGACACAGACCCTTATGTCCAAGGTCAAGTGGAGTATCTGGAAAAAGCCCTTG  
GATGGTGTCAAAAATACGGATTGAAAGCATGGGTTGATCTACATGGTGTTCAGGTTCT  
CAAAATGGGTTGACAATTCGGTTTTGCGTGACGTATATGAGTGGCAATCCAACGAATG  
GTACCAAACAGTTACCTACTCTGTTCTTGGTGAATTTGCGCAAAAATACTCTGCTTCAG  
AATATAACGACGTTGTTATTGGAATTGAATTGGTCAATGAACCGCTGGGTCCAATTTTG  
AACGATACAGAACTGAAGGAATATTATAACAATGGTTATGAAATTGTTAGAAAGGAAGG  
TGATGTTCTGTATCATCCACGATGCCTTTTTACAACACTGACTCATTACTGGGATGATG  
TGCTCAATACCGAGATTGATCCAATGTATGGGATGTTATTCTTGATCACCACCCTAC  
CAGATTTTCTCCGTTCTGAGTTGAGTAGGACTATTGATGAACACGTCAACTATGCATG  
TTATCTAGGTACTGAAGAAGCTGAAGAGTATCATACTGATCTTTGCGGTGAGTGGACTG  
CGGCCTTGACTGATTGCGGCAAATGGGTCAATGGTTTGGGTTTAGGCGCAAGATGGGAC  
GCTACTTACGATAACTCGACTCCGCTGGGTACGTGTGATAATTTGTACGTGGCAGACTA  
TGCTTACTTCCAGAACGAGGATGTGCGTTCAACTTACAGAAGATACGTAGAAGCACAAA  
TGGACGCATATATGAATAAAAAGATGTCCGGCTGGGTGTTTTGGTGTGGAAAACCTGAG  
AATTTGATTGAATGGGATTTCAAGCAGTTAATCTCACTCAACATCATTCACAGCCATT  
GAGTGCAAGAGAGTATCCTAACCAATGTGGCTATGATTCCTTAGTCATGTAATTAGTTAT  
GTCACGCTTACATTCACGCCCTCCTCCCACATCCGCTTAACCGAAAAGGAAGGAGTTA  
GACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTTAATAGTTATGTTAGTATTAAGAA  
CGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTTTCTGTACAAACGCGTGTACGCATGTAAC  
ATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGC

**Secuencia nucleotídica de producto de fusión ENDpBGL::CYCt. Se indican el promotor (en azul), la secuencia de BGL (en rojo) y el terminador (en verde)**

CAGATGCGAAAAGCACAATTTCCAAAAAGTGATTGACTGTCCCTGATAATATTTTTTTTTTT  
 TTTGAACAAAAAACTAAAGATCTGCTTTTTCAAGAAGGTGATCAACTAAAAGGTTTATTAA  
 AAGATCGAAAGTTCAGCTTGTGTTCAAAGAAAACGTTATTAACAACAAAACTGGAACACA  
 CTAACCAGGATATTTTTGCAGCAGTCACATCATGACTAATTCTTTGAAATAATAACTCA  
 AAGAAAAATAATCTGGAACCTGAAATTAGATTCAAAAATTTAAAAAGTACGGGATGTTCTCA  
 TGAAATCAAAATTTCAGAATCTGGGTCCAAAGTTGTTTCAAAGAGATTTTCGAATTTATC  
 GAATTAGTTGCCTACATATCGAAGTTTCGGAGTTTCTGTGTTATGGTCCGCTTTATCTTGT  
 TTTCTGAAAACAATCAGGCAATCAAAAAAACTAAATCATCTATCGTAAACTCAAATAGTGA  
 ATGAAACAGTTTTATTGTAAATAAGAGCGGTAACGACCCTGATATGAAAGGTGGATGTCTA  
 GATTCAGTTACAATCGCCAGAGTCGCCATTAAGAAATAAAATTTCCGGTTGAGAAAAA  
 AGGGCATGGAGCGGAAATTAACATGTGATGTGCTTTGTTTACATTGCTGGATCAATTAA  
 AATTTTTTAAATCGCTATTGTTTTTTTTTCATTCCGAGGAAGGTCCATAAAGTATTTTTTCCG  
 TGGCCCAATTTAGGTAATTCGCTTATCGTTTAAAGGAGTGTAAAAAAAAGCATCAAGAGTT  
 TGCTATTTTGGGCTGTGTCAGTTCTGGCTCAATCGTACAATCTTCGTTTCTGCTTCTCGT  
 TTATAGACGTTTTATTAGCTTGTGTTGATTTTGTGTCATCATTTAGTTTCCGGTTATTTTGC  
 ATGTTTGTGTTAGAAAATCTATAAATAATTGTTGTTTCCCCCTTTGTTTGATGAGGTCCT  
 GCCCTCTACCTGTTCTTTCTTCAGCTCTCTTAAAAACAAGGTAAGCTTCACCCTTAAATA  
 TAGAAGAAAATGAAATTATCCACATTCATTTCACTGTTTTCTCTAATCTCCTTAGCATCGA  
 CTGCTCCTGTGAAACTGCAAAGAAAAATTCAGATGGGATTATGAATCCGAAAAGATATA  
 TGGTGTCAACATCGGTGGTTGGTTGGTTTTGGAGCCATACATTGTTCCATCTTTGTTTGAA  
 GCCTTTGGTGGAGAAGACTCTACCAACCAGTAGATGAGTATCATTTTTTCAGCAACATACG  
 GTAAGAAAAAGCCGAGGAAGTTCTTCAGCAGCATTGGTCTACTTTCTATACAGAAGAAGA  
 CTTTCAATTAATGGCTGAATATGGTCTCAATTTGTTAGAATCCAATTGGTTACTGGGCC  
 TTCCAATTAATGACACAGACCCTTATGTCCAAGGTCAAGTGGAGTATCTGGAAAAAGCCC  
 TTGGATGGTGTCAAAAAATACGGATTGAAAGCATGGGTTGATCTACATGGTGTTCAGGTTT  
 TCAAAATGGGTTGACAATTCGGTTTTGCGTGACGTATATGAGTGGCAATCCAACGAATGG  
 TACCAACAGTTACCTACTCTGTTCTTGGTGAATTTGCGCAAAAATACTCTGCTTCAGAAT  
 ATAACGACGTTGTTATTGGAATTGAATTGGTCAATGAACCGCTGGGTCCAATTTTGAACGA  
 TACAGAACTGAAGGAATATTATAACAATGGTTATGAAATTGTTAGAAAGGAAGGTGATGTT  
 CCTGTATCATCCACGATGCCTTTTTACAACCTGACTCATTACTGGGATGATGTGCTCAATA  
 CCGAGATTGATCCAAATGTATGGGATGTTATTCTTGATCACCACCACTACCAGATTTTCTC  
 CGTTCCTGAGTTGAGTAGGACTATTGATGAACACGTCAACTATGCATGTTATCTAGGTAAT  
 GAAGAAGCTGAAGAGTATCATACTGATCTTTGCGGTGAGTGGACTGCGGCCTTGACTGATT  
 GCGGCAATGGGTCAATGGTTTGGGTTTAGGCGCAAGATGGGACGCTACTTACGATAACTC  
 GACTCCGCTGGGTACGTGTGATAATTTGTACGTGGCAGACTATGCTTACTTCCAGAACGAG  
 GATGTGCGTTCAACTTACAGAAGATACGTAGAAGCACAAATGGACGCATATATGAATAAAA  
 AGATGTCGGCTGGGTGTTTTGGTGTGGAAAACTGAGAATTTGATTGAATGGGATTTCAA  
 GCAGTTAATCTCACTCAACATCATTCCACAGCCATTGAGTGCAAGAGAGTATCCTAACCAA  
 TGTGGCTATGATTCTTAGTCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCTCCTCC  
 CACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTAT  
 TTTTTTAAATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTATTTATATTTCAAATTTTCTTTTTTT  
 TCTGTACAAACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTG  
 GGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGC