

# Informe final publicable de proyecto

## Obtención de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* productora de una beta-glucosidasa de *Issatchenkia terricola* y explotación del genoma de esta levadura nativa para la identificación de nuevas enzimas con potencial aplicación en enología

Código de proyecto ANII: FMV\_1\_2017\_1\_136574

31/08/2021

**GONZÁLEZ POMBO, Paula Virginia** (Responsable Técnico - Científico)

**DOURRON FERNANDEZ, Juliette** (Investigador)

**VILLARINO, Andrea Elizabeth** (Investigador)

**COSTÁBILE CRISTECH, Alicia** (Investigador)

**DE OVALLE PRESA, Stefani Gisell** (Investigador)

**RAMÓN PACHECO, Ana** (Co-Responsable Técnico-Científico)

---

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \ \

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \ \

FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

## Resumen del proyecto

El desarrollo del aroma del vino depende en gran parte de la existencia durante la elaboración, de enzimas (glicosidasas) capaces de actuar eficientemente sobre los sustratos glicosídicos existentes, generando compuestos volátiles. Estudios previos de nuestro grupo con enzimas aisladas de la microbiota de viñedos uruguayos, demostraron que una beta-glucosidasa de la cepa *Issatchenkia terricola* presenta propiedades muy promisorias en condiciones enológicas y se destaca por impartir características aromáticas propias a los vinos locales. Sin embargo, los bajos niveles producidos por la cepa autóctona constituyen una limitante para la manipulación y posible aplicación biotecnológica de dicha glucosidasa. Con el objetivo de clonarla y expresarla en *Saccharomyces cerevisiae* con mayor rendimiento, nos encontramos actualmente focalizados en obtener la secuencia de dicha glucosidasa mediante el diseño de cebadores degenerados, dado que no disponemos aún del genoma de *I. terricola*. La cepa generada será utilizada en ensayos de microvinificaciones y análisis químico y sensorial de aromas de los vinos obtenidos. Complementariamente, se propone avanzar en la caracterización molecular mediante secuenciación masiva del genoma de *I. terricola*. Esto permitirá identificar la presencia de otros genes codificantes para beta-glucosidasas así como otras glicosidasas. Asimismo, la interpretación del genoma permitirá identificar otras actividades enzimáticas con potencial interés biotecnológico. El proyecto implica el diseño y uso racional del potencial existente en la microbiota nativa enológica, integrando conocimientos desde un enfoque multidisciplinario desde las áreas de bioquímica, biología molecular, genómica y química de aromas. Los resultados podrían generar productos potencialmente transferibles a la industria enológica.

**Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Enología**

**Palabras clave: beta-glucosidasas / *Issatchenkia terricola* / enología /**

## Introducción

Una de las características que define la calidad de un vino es su aroma. El mismo es el complejo producto de un conjunto de procesos bioquímicos y tecnológicos que se combinan para llegar al resultado buscado, y está determinado por más de 500 compuestos volátiles en concentraciones que varían desde algunos ng/L hasta centenas de ug/L, y en algunos casos hasta mg/L según algunos datos analizados [1,2]. La complejidad aromática es conferida principalmente por compuestos terpénicos y se clasifican en diversos grupos. Los aromas primarios o varietales, son aquellos provenientes de la propia uva y son los que definen la calidad y el tipo de vino obtenido, los secundarios y terciarios en cambio son aquellos generados durante la fermentación y el añejamiento [3]. En los últimos años se ha visto que la gran mayoría de los compuestos terpénicos se encuentra en forma de glicósidos, los cuales por no ser volátiles no contribuyen directamente al aroma. Este tipo de precursores aromáticos glicosilados está presente en una gran variedad de frutas y particularmente en uvas, lo que ha despertado un gran interés en la industria vitivinícola [4,5]. Se ha identificado tanto en uvas como en vinos, agliconas unidas tanto a una molécula de glucosa (b-D-glicósidos) como a disacáridos, formando arabinoglucopiranosido, ramnoglucopiranosido, y apioglucopiranosido. Durante la elaboración del vino permanecen una gran cantidad de estos precursores inodoros sin hidrolizar, constituyendo una reserva de aroma potencial, siendo éstos muy relevantes dadas las propiedades sensoriales que presenta la molécula de aglicona una vez que ésta es liberada de la molécula de azúcar a la cual está unida [6,7]. Dada la alta especificidad que presentan las enzimas, la hidrólisis enzimática se destaca frente a la hidrólisis ácida por no alterar la estructura de la aglicona, confiriendo un aroma más natural. Es por ello que se ha reportado la aplicación de varias glicosidasas con la finalidad de liberar compuestos aromáticos tanto en vinos como en diferentes jugos de frutas [8]. Para lograr la liberación de la aglicona mediante hidrólisis enzimática a partir de precursores glicosídicos, son necesarias las siguientes actividades secuenciales: 1)  $\alpha$ -ramnosidasa,  $\alpha$ -arabinosidasa, o b -apiosidasa para escindir el enlace inter-azúcar; 2) b-glucosidasa para hidrolizar los b -D-glicósidos. Estas cuatro actividades se encuentran dentro de la familia de las glicosidasas. Dado que los b-D-glicósidos constituyen la fracción más importante del total de los glicoconjugados presentes en jugos de frutas y vinos, es muy relevante el rol de las b-glucosidasas en el último paso para la liberación de aromas. Beta-glucosidasa, enzima clave para el desarrollo de aromas de vinos La beta-glucosidasa (beta-D-glicósido-hidrolasa, E.C. 3.2.1.21) es la enzima que hidroliza la unión entre una molécula de glucosa y el sustituyente sobre el carbono anomérico, generando la liberación de la aglicona (volátil). Por lo tanto, el uso de beta-glucosidasas en la industria del vino es potencialmente muy interesante

porque puede promover la liberación de los compuestos aromáticos a partir de los precursores glicosídicos presentes en vinos [9-11]. Sin embargo, la actividad de las beta-glucosidasas de la propia uva así como las de *Saccharomyces* son insuficientes para llevar a cabo esta transformación enzimática dado que las mismas se inactivan durante las drásticas condiciones enológicas (pH 3-4, alta concentración de glucosa en mosto y etanol). Es por esto que hace algunos años se ha centrado la atención en el uso de beta-glucosidasas exógenas, especialmente preparaciones de glucosidasas de hongos filamentosos, para incrementar el aroma de los vinos. Sin embargo, estas preparaciones son impuras y a menudo contienen distintas actividades enzimáticas adicionales y pueden ocasionar transformaciones indeseables de las agliconas libres, produciendo compuestos aromáticos no deseados con aromas desagradables [12-13]. Adicionalmente, el uso de los mismos extractos comerciales por distintos productores de vinos en el mundo, conlleva a características aromáticas similares, perdiéndose tipicidad y causando que estos vinos sean menos competitivos en el mercado. Una alternativa al uso de estas preparaciones fúngicas exógenas, es el uso de enzimas específicas contenidas en las levaduras que forman parte del ecosistema del vino y adaptadas al ambiente enológico [14-15].

Papel de la beta-glucosidasa de *Issatchenkia terricola* en la tipicidad aromática de vinos nacionales Hace varios años que los enólogos, especialmente en los países del viejo mundo, descubrieron que las levaduras nativas (principalmente no-*Saccharomyces*) son una parte integrante esencial para la autenticidad de sus vinos, ya que éstas le impartían características regionales y otras características deseables a los mismos [18-19]. Esto es debido, en gran parte, a la existencia de enzimas capaces de actuar eficientemente sobre los sustratos glicosídicos permitiendo la liberación de los compuestos volátiles durante el proceso de elaboración de vinos. Actualmente, contamos con una colección de cepas no pertenecientes al género *Saccharomyces* aisladas de ambientes enológicos de Uruguay, seleccionadas por la Sección Enología de Facultad de Química. Nuestro grupo de investigación viene trabajando hace varios años en la selección y desarrollo de nuevos biocatalizadores beta-glucosidasa, a partir de dichas colecciones (*Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora ovarum* e *Issatchenkia terricola* [3, 15, 16]. De las estudiadas, la beta-glucosidasa de *I. terricola* presentó propiedades promisorias en cuanto a actividad y estabilidad en condiciones enológicas: altas concentraciones de glucosa y bajos valores de pH del vino. Sin embargo, la especie *Issatchenkia terricola* ha sido descartada para su uso en fermentaciones mixtas por producir niveles elevados de ácido acético lo que conlleva a la producción de vinos "avinagrados" [17], lo que obliga a buscar estrategias alternativas para poder aprovechar los beneficios de sus beta-glucosidasas. En especial, la beta-glucosidasa se destacó por su excelente actividad sobre los glicósidos monoterpénicos y norisoprenoides en vinos, como lo demuestran los estudios sensoriales y analíticos realizados [16]. Los vinos tratados con beta-glucosidasa de *I. terricola* se distinguen claramente del vino sin tratamiento y del tratado con el biocatalizador de *A. niger* (comercial) usado como referencia. Los descriptores encontrados para el vino tratado fueron notas agradables de aroma a miel, pasas y frutas, demostrando que esta enzima no solo es capaz de incrementar volátiles sino que éstos aportan cierta complejidad y tipicidad aromática [3]. Sin embargo, actualmente nos encontramos ante una gran dificultad que son los bajos rendimientos de producción de beta-glucosidasa por *I. terricola* limitando la posibilidad de escalar el proceso y evaluar su posible aplicación tecnológica. Por lo tanto, se justifica el uso de herramientas moleculares para abordar esta limitante y desarrollar nuevas estrategias de aplicación de la enzima de interés. El vino, la biotecnología y la genómica en enología.

Mundialmente, la exigencia actual del mercado enológico conlleva a una intensa búsqueda de cepas vínicas con características distintivas para obtener tipicidad aromática y vinos cada día más sofisticados. Es por esto que la diversidad genética natural es cada vez más difícil de explotar con estos objetivos, y por tanto es más ventajoso recurrir a estrategias de mejora genética de cepas previamente seleccionadas y con un historial de aplicación eficiente [20]. Durante los últimos veinte años se ha intentado llevar a cabo mejoras genéticas dirigidas en cepas vínicas mediante procedimientos clásicos. Actualmente, se dispone de técnicas de ingeniería genética que permiten aislar genes concretos, modificarlos en el laboratorio y re introducirlos en el organismo original o en otro distinto, generando los llamados organismos modificados genéticamente (abreviadamente OMG). La enología y la viticultura no han sido ajenas a estos desarrollos y se ha comenzado a aplicar ingeniería genética sobre vid y sobre levaduras vínicas con resultados variados [20, 21]. Por otro lado, si bien la aplicación comercial de microorganismos genéticamente modificados genera controversias, cada vez son más aceptados. Existen en la actualidad levaduras modificadas genéticamente, reconocidas como seguros a nivel alimentario (del inglés GRAS, Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) disponibles en el mercado [22, 23]. Es esperable que nuestro país, a su ritmo, acompañe esta tendencia que se viene desarrollando en Canadá, Estados Unidos, Europa y Australia donde la biotecnología aplicada a la enología no ha encontrado tantas barreras y la tradición vitivinícola es más reciente que en el Viejo Mundo. Aislamiento, clonado y expresión para la producción de beta-glucosidasas eficientes y novedosas. Con la finalidad de obtener una beta-glucosidasa con propiedades de actividad y estabilidad mejoradas, desde hace algunos años distintos investigadores han adoptado varios enfoques como son; la expresión heteróloga de genes de beta-glucosidasa de diferentes fuentes, la evaluación del uso de la enzima inmovilizada en diversos soportes [24], así como mutagénesis sitio dirigida para mejorar

la eficacia catalítica de la enzima [25, 26]. El clonado y la expresión en huéspedes adecuados para la producción a gran escala de la beta-glucosidasas continúa siendo el foco de actuales investigaciones. De hecho varias beta-glucosidasas de bacterias, muy pocas de levaduras y algunas de hongos, plantas y animales han sido clonadas con la intención de producir esta enzima a gran escala para diversas aplicaciones biotecnológicas [27, 28, 29]. Los organismos más utilizados para el clonado y expresión de beta-glucosidasas son *E. coli* y huéspedes eucariotas tales como *S. cerevisiae* y hongos filamentosos.

Desde hace varios años la línea de investigación de nuestro grupo se orienta hacia la selección, desarrollo y el estudio de nuevos biocatalizadores beta-glucosidasa, a partir de colecciones de cepas no-*Saccharomyces* nativas de Uruguay (*Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora ovarum* e *Issatchenkia terricola* [3, 15, 16]. Actualmente, contamos con una beta-glucosidasa de la levadura *I. terricola* purificada en el laboratorio, con un gran potencial de aplicación enológico en cuanto a sus propiedades de actividad y estabilidad sobre los precursores aromáticos en condiciones enológicas [16]. Sin embargo sus bajos rendimientos de producción por *I. terricola* limitan la posibilidad de su aplicación biotecnológica. En este contexto y considerando los antecedentes descritos, esperamos obtener como producto una cepa de *S. cerevisiae* que exprese el gen de ésta beta-glucosidasa de *I. terricola* y explorar la capacidad de esta cepa modificada como liberadora de aromas durante el proceso de fermentación. *S. cerevisiae* se caracteriza por ser una excelente fermentadora y es uno de los organismos aceptados en la industria alimentaria. La obtención del genoma de *I. terricola* nos permitirá identificar la secuencia codificante de la beta-glucosidasa que nos interesa, así como la de otras posibles beta-glucosidasas presentes en el genoma. Además, mediante la identificación de otras enzimas glicosidasas de interés enológico nos permitirá expandir las posibilidades biotecnológicas de esta levadura autóctona. Las cepas nativas representan un potencial interesante en el mejoramiento de la complejidad aromática de vinos, y desde hace algunos años se les viene prestando especial atención. Muchas de las propiedades promisorias de estas cepas se deben a la producción de enzimas (glicosidasas) con potencial interés enológico. Además de las beta-glucosidasas, otras glicosidasas como mencionamos anteriormente, son relevantes desde el punto de vista enológico como ser las ramnosidasas, arabinosidasas y apiosidasas, ya que están directamente involucradas en un mecanismo secuencial de hidrólisis y por lo tanto a la contribución del aroma de los vinos. Es por este motivo, que se propone estudiar las propiedades bioquímicas de estas enzimas para caracterizarlas y evaluar su posible rol en enología. La carencia de información genética sobre estas cepas hace que muchas potenciales enzimas permanezcan inexploradas hasta el momento. Por lo cual todo avance que apunte hacia la obtención de genomas de cepas autóctonas es de suma relevancia, ya que permitirá identificar toda la gama de genes presentes en la especie. Esperamos que esta información contribuya al desarrollo de vinos de mejor calidad en nuestro país.

## **Metodología/diseño del estudio**

### **ACTIVIDADES RELACIONADAS AL OBJETIVO ESPECÍFICO 1**

El ADN genómico de *I. terricola* extraído con un kit comercial (Zymo research) se envió a secuenciar a (Macrogen, Korea), mediante las tecnologías Illumina y PacBio. Como estrategia complementaria, se realizó la secuenciación de transcritos (RNAseq) para asistir al proceso de anotación. Una vez analizada la calidad y corregidos los "reads", se ensambló el genoma con la herramienta Flye. La anotación del genoma se realizó utilizando el conjunto de herramientas Braker v 1.9 y la anotación funcional con InterProScan, Blast y KEGG. Una vez obtenido y anotado el genoma, se buscaron betaglucosidasas y otros genes de interés enológico.

### **ACTIVIDADES RELACIONADAS AL OBJETIVO ESPECÍFICO 2**

2.1 Las secuencias codificantes de los genes de glicosidasas identificados en el genoma, se amplificaron por RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) con cebadores específicos, a partir de ARN obtenido de cultivos de *I. terricola* crecidas en condiciones en que se conoce que se da la expresión de la BGL previamente estudiada. Los productos de PCR purificados se clonaron en un vector de expresión, que se transformó en *E. coli*. Se optimizaron las condiciones de expresión, y se purificó la enzima mediante cromatografía de afinidad por metales.

2.2 Caracterización de las enzimas purificadas. Se determinó su estructura cuaternaria mediante page-SDS, su masa molecular (MM), y condiciones óptimas de actividad y estabilidad, en especial en condiciones enológicas (bajos pH, presencia de glucosa y etanol), presencia de isoformas por 2D-PAGE. Se evaluó especificidad de las enzimas obtenidas frente a sustratos sintéticos (con configuración alfa y beta) y naturales (disacáridos y otros).

### **ACTIVIDADES RELACIONADAS AL OBJETIVO ESPECÍFICO 3**

3.1 Se identificó *in silico* la secuencia codificante completa de beta-glucosidasa *I. terricola*. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar la secuencia codificante completa, por RT-PCR (retrotranscripción-PCR). El producto de PCR se purificó y clonó en un vector comercial y fue secuenciado para verificar su identidad, como etapa previa a su expresión en *S. cerevisiae*.

#### ACTIVIDADES RELACIONADAS AL OBJETIVO 4

4.1 Se realizaron construcciones génicas para la expresión de la beta-glucosidasa de *I. terricola* por Fusión-PCR. Las fusiones generadas constaron de la secuencia codificante de la beta-glucosidasa y la región 3' que incluye el terminador de transcripción, bajo el control de diferentes promotores (promotor endógeno, promotor constitutivo fuerte ACT1 y promotor regulable ADH1) a lo largo del proceso de vinificación.

4.2 Se transformó la cepa de origen vínico T73-4 con las construcciones realizadas según se describe en el punto 4.1, seleccionando los transformantes por su habilidad de crecer en un medio carente de uracilo. La integración de las construcciones se verificó por PCR colonia.

4.3 Se verificó la expresión de la beta-glucosidasa mediante revelado específico en geles de poliacrilamida utilizando el sustrato fluorogénico MUG.

#### ACTIVIDADES OBJETIVO ESPECÍFICO 5.

Microvinificaciones: se realizaron pruebas de fermentación a escala de laboratorio en jugo de uva, para observar la capacidad fermentativa de la cepa generada y las características sensoriales desarrolladas.

Se realizó un "pie de cuba" con la cepa a estudiar, manteniendo una temperatura de 24°C durante 24 horas con una agitación de 100 rpm. La fermentación alcohólica se realizó por duplicado. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura controlada de 25°C y su seguimiento se realizó controlando la liberación de CO<sub>2</sub> mediante la pérdida de peso.

#### ACTIVIDADES OBJETIVO ESPECÍFICO 6

Se realizará la extracción de volátiles mediante fase sólida utilizando cartuchos Isolute ENV+. Se realizará la cuantificación de compuestos volátiles por cromatografía gaseosa (GC) y determinación de índices de Kovats de los compuestos.

### Resultados, análisis y discusión

Se realizó la secuenciación y anotación del genoma de *I. terricola*. Se logró un ensamblado de tamaño esperado, aproximadamente 13 Mpb, formado por 15 contigs (de los cuales 5 tienen un largo mayor a 1.000.000 pb) y un N50 de 3.383.105 pb. Con el programa Braker y los datos de RNAseq se predijeron 5.378 genes codificantes para proteínas. De las 5.378 proteínas predichas en *I. terricola* 2.834 fueron asignadas a términos KEGG. Entre éstas, 1.164 fueron identificadas como enzimas y 40 como glicosilhidrolasas. Con el resultado de blast contra la base de Swissprot se encontraron 10 enzimas identificadas como b-glucosidasas. Uno de éstos genes es el correspondiente al gen de la b-glucosidasa 4180 de interés por nuestro grupo. Las secuencias de las otras nueve proteínas identificadas mediante Blast como b-glucosidasas fueron sometidas a alineamiento y a un análisis filogenético, para analizar las relaciones evolutivas entre los distintos genes. Para seleccionar las dos enzimas para ser expresadas se eligió una b-glucosidasa de la familia GH 17 (989) y otra de la familia GH132 (3296). Ambas pertenecen a familias distintas a la familia GH5 a la que pertenece la b-glucosidasa purificada anteriormente por nuestro grupo (4180). Las secuencias codificantes de ambas enzimas fueron clonadas y una de ellas expresada en forma recombinante en *E. coli*. Tras ensayar una multiplicidad de condiciones de cultivo e inducción, se logró expresar exitosamente a 37°C la proteína 989 fusionada a His-tag/DsbC, pero en forma insoluble. En este contexto no se pudo detectar proteína recombinante en los extractos celulares, en ninguna de las condiciones ensayadas. Como ha sido reportado en la literatura, no se puede descartar que el péptido señal de la proteína 989 pueda ser reconocido como tal en *E. coli*. La estructura de los péptidos de señalización eucariotas es similar a la de procariotas. De hecho, el predictor de péptido señal (SignalP) reconoce la región de la proteína que corresponde al péptido señal y es clasificada tanto como péptido eucariota como procariota. La posibilidad de que el péptido señal de la enzima 989 sea funcional en *E. coli* sugiere la importancia de analizar los sobrenadantes de cultivo. Teniendo en cuenta estas evidencias se realizó una construcción para ensayar la expresión de la proteína 989 sin el péptido señal. Nuestros resultados muestran que no se puede descartar que la proteína se encuentre en la FI de un cultivo de expresión a 37°C. Siendo todos estos intentos infructuosos, se procedió a ensayar la expresión de la enzima 989 como una fusión con DsbC, en donde fue posible expresar una proteína cuyo peso molecular coincide con el esperado para la fusión de 989 a DsbC, estando la misma en forma insoluble. Se confirmó la identidad de la proteína mediante SDS-PAGE y MALDI-TOF de la fracción insoluble.

Una vez ensamblado el genoma (Tesis Maestría, Lic. Juliette Dourron), y a partir de los datos del análisis de espectrometría de masas de la proteína pura, fue posible identificar al gen g4180 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-b-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). Mediante utilización de la herramienta BLASTp en Uniprot, se observó que la secuencia de aminoácidos coincide un 73% con la de la enzima glucan-?-1,3-glucosidasa de *I. orientalis* y en menor porcentaje a otras enzimas de este tipo, reportadas para otras levaduras (*Pichia*

angusta, *Brettanomyces bruxellensis*, entre otras). En todos los casos, estas proteínas pertenecen a la familia GH5, una de las más grandes familias y cuyas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas entre Archaea, bacterias y eucariotas, principalmente en hongos y plantas. 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 oligonucleótidos, ahora sí específicos, para la b-glucosidasa de *I. terricola*, mediante los cuales se logró obtener la secuencia codificante (CDS) mediante PCR. Dicho producto fue clonado en el vector Topo TA (ThermoFischer) transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$  y enviado a secuenciar. Afortunadamente, la secuencia coincidió en un 100% con la de la b-glucosidasa de interés.

Se realizó la generación de una cepa de *S. cerevisiae* para la expresión de la bgl g $\alpha$ 4180 mediante dos estrategias diferentes. Para la generación de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que exprese la b-glucosidasa de *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. Desafortunadamente, pese a varios intentos modificando condiciones de co-transformación, no se obtuvo éxito en las transformaciones mediante esta estrategia. Se probaron diferentes protocolos de transformación con LiAc descritos para *S. cerevisiae* sin éxito para ninguno de ellos. Mediante esta estrategia se pretendía generar una cepa 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 recurrió al uso de vectores de expresión (pESC-URA) de manera de insertar la secuencia de interés en el genoma de *S. cerevisiae*. Afortunadamente, se obtuvieron varias colonias que contenían el inserto. Del resultado del screening de actividad b-glucosidasa se confirma la actividad expresada en los clones recombinantes. Esto sugiere que las cepas generadas de *S. cerevisiae* conteniendo el gen de la BGL bajo los promotores ADH1p y ENDp, pueden ser usadas en fermentaciones a pH ácido y ser evaluadas comparativamente con la cepa *S. cerevisiae* como control en cuanto a la liberación de compuestos aromáticos de interés.

## Conclusiones y recomendaciones

En nuestro país el estado actual de avance en cuanto al conocimiento de genomas de cepas nativas de levaduras vínicas es escaso. Las cepas nativas representan un potencial interesante en el mejoramiento de la complejidad aromática de vinos, y desde hace algunos años se les viene prestando especial atención. La carencia de información genética sobre estas cepas hace que muchas potenciales enzimas permanezcan inexploradas hasta el momento. En este trabajo se obtuvo un ensamblado y anotación de buena calidad del genoma de la levadura nativa *I. terricola* para la cual no se contaba con datos de secuenciación. Cabe destacar que hasta el momento, a nivel internacional, pocas cepas vínicas fueron estudiadas desde un punto de vista genético.

Se identificó dentro de las proteínas anotadas en el genoma la secuencia de una b-glucosidasa purificada previamente por nuestro grupo, permitiendo un abordaje molecular para la producción de la enzima. Además, se identificaron 10 posibles b-glucosidasas y una posible arabinosidasa, que podrán ser estudiadas en profundidad por su posible rol enológico. La disponibilidad de las secuencias codificantes de estas proteínas abre la posibilidad de clonar, modificar, expresar en forma heteróloga, purificar y caracterizar estas proteínas.

El conocimiento del genoma de *I. terricola* abre las puertas a entender la fisiología de este organismo, analizando las vías de utilización de fuentes carbonadas y nitrogenadas, vías de síntesis de compuestos que generan aromas, genes que codifican transportadores, etc. Un análisis comparativo del genoma de esta levadura frente a *S. cerevisiae* y a otras levaduras vínicas permitiría evaluar diferencias en el contenido génico que expliquen las características que imparten las distintas cepas (modulación de aromas y sabores) en el proceso de vinificación.

En este trabajo se incluyeron datos de secuenciación de ARNm para asistir a la anotación del genoma. Además de permitir el conocimiento del proteoma de una cepa nativa, en un futuro, para evaluar los niveles de transcripción de los distintos genes se deberían realizar réplicas de las distintas condiciones de cultivo para la extracción y secuenciación de ARNm. De esta manera, se podrá evaluar estadísticamente la expresión diferencial de genes en distintas condiciones de interés enológico.

Del análisis del genoma de *I. terricola* se seleccionaron dos b-glucosidasas para su expresión como proteínas recombinantes. Las secuencias codificantes de ambas enzimas fueron clonadas y una de ellas expresada en forma recombinante en *E. coli*. Tras ensayar una multiplicidad de condiciones de cultivo e inducción, se logró expresar exitosamente a 37°C la proteína 989 fusionada a His-tag/DsbC, pero en forma insoluble.

En este trabajo también se obtuvo la construcción de la proteína His-tag-989 con péptido señal. En este contexto no se pudo detectar proteína recombinante en los extractos celulares, en ninguna de las condiciones ensayadas. Teniendo en cuenta

estas evidencias se realizó una construcción para ensayar la expresión de la proteína 989 sin el péptido señal. Nuestros resultados muestran que no se puede descartar que la proteína se encuentre en la FI de un cultivo de expresión a 37°C. Sin embargo, hacen falta más experimentos para confirmarlo, como por ejemplo, verificar por espectrometría de masas su identidad. Dadas las ventajas de expresar proteínas recombinantes en forma soluble, sería aconsejable probar otras fusiones con otras proteínas o tags que puedan influir en la solubilidad y/o estabilidad de la proteína producida.

Como alternativa al uso de las proteínas recombinantes se desarrollaron cepas de levadura genéticamente modificadas para expresar las actividades de interés. En este sentido, se planteó como alternativa a la expresión en *E. coli* la obtención de cepas de *S. cerevisiae* expresando las glucosidasas seleccionadas. La estrategia elegida permite la obtención de cepas recombinantes libres de secuencias de origen bacteriano lo cual facilita su aplicación biotecnológica en el área alimentaria. Se obtuvieron para las dos enzimas de interés las construcciones necesarias para el desarrollo de esta estrategia y la transformación de *S. cerevisiae*. La expresión en *S. cerevisiae* es sencilla y directa para obtener las enzimas puras y en cantidad suficiente para proceder a la caracterización bioquímica y estructural de las mismas.

## Referencias bibliográficas

- [1] Versini G, Grando MS, Stefanini M, Dellacassa E, Carrau F (1999) Chemical, ampelometric and molecular methods applied for the identification of the uruguayan "Moscatel Miel" variety as the Italian "Moscatel Giallo". *Quad Vitic Enol Univer*.
- [2] 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. *J Agric Food Chem* 51: 5408-5413.
- [3] González-Pombo P (2010) Tesis Doctoral en Química. Universidad de la República-Facultad de Química (Montevideo, Uruguay).
- [4] Olguín N, Alegret JO, Bordons A, Reguant C (2011)  $\beta$ -glucosidase activity and *bgl* gene expression of *Oenococcus oeni* strains in model media and Cabernet Sauvignon wine. *Am J Enol Vitic* 62:99–105.
- [5] Palmeri R, Spagna G (2007)  $\beta$ -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb Technol* 40:382–389.
- [6] Mateo JJ, Jiménez M (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *J Chromatogr A* 881:557–567.
- [7] Segurel MA, Baumes RL, Langlois D, Riou C, Razungles AJ (2009) Role of glycosidic aroma precursors on the odorant profiles of grenache noir and syrah wines from the rhone valley . part 2: characterisation of derived compounds. *J Int Sci Vigne Vin* 43 (4): 213–223.
- [8] Cordonnier RE, Gunata Z, Baumes RL, Bayonove C.L (1989) Recherche d'un materiel enzymatique adapté à l'hydrolyse des precurseurs d'arome de nature glycosidique du raisin. *Connaiss Vigne Vin* 23:7–23.
- [9] Baffi MA, Tobal T, Henrique J, Rodrigo SR, Boscolo M, Gomes E, Da-Silva R (2011) A Novel  $\beta$ -Glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus*: Characterization and Application in Winemaking. *J Food Sci* 76: 997–1002.
- [11] Baffi MA, Martin N, Tobal TM, Ferrarezi AL, Ghilardi Lago JH, Boscolo M, Gomes E, Da-Silva R (2013) Purification and characterization of an Ethanol-Tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and Its Potential Hydrolysis of Wine Aroma Precursors. *Appl Biochem Biotechnol* 171 (7): 1681-1691.
- [12] 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 Chem* 140:245–254.
- [13] Sefton MA, Francis IL, Williams PJ (1994) Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Sauvignon blanc. *J Food Sci* 59:142–147.
- [14] Nicolini G, Gunata Y, Versini G, Dugelay I, Mattivi F (1994) Use of glycosidase enzyme in must: Effect on the chemical and sensory characters of the wines. In *Connaissance aromatique des cepages et qualite des vins. Actes d Symposium International. Revue Francaise d' Oenologie* 00 257-266.
- [15] González-Pombo P, Pérez G, Carrau F, Guisán JM, Batista-Viera F, Brena, B.M (2008) One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol Lett* 30: 1469–1475.
- [16] González-Pombo, P, Fariña L, Carrau F, Batista-Viera F, Brena BM (2011) A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochem* 46: 385–389.
- [17] Jolly NP, Augustyn OHP, Pretorius IS (2003) The effect of Non-Saccharomyces yeasts on fermentation and wine quality. *South African J Enol Vitic* 24:55–62.
- [18] Ganga MA, Martínez C (2004) Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. *J Appl Microbiol* 96:76–83.
- [19] Clemente-Jimenez JM, 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 Microbiol* 21, 149–155.
- [20] Sánchez-Torres P, González-Candelas L, Ramón D (1998) Heterologous Expression of a *Candida molischiana* Anthocyanin- $\beta$ -glucosidase in a Wine Yeast Strain. *J Agric Food Chem* 46: 354-360.
- [21] Manzanares P, Orejas M, Vicente Gil J, de Graaff LH, 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. *App and Env Microb* 69 (12): 7558-7562
- [22] Husnik JI, Delaquis PJ, Cliff MA, Van Vuuren HJJ (2007) Functional analyses of the malolactic wine

yeast ML01. *Am J Enol Vitic* 58: 42–52.

[23] Tobergte DR, Curtis S (2013) GRAS Notification for the use of a modified yeast for reduction of ethyl carbamate in fermented beverages. *J Chem Inf Model* 53: 1689–1699.

[24] Keerti, Gupta A, Kumar V, Dubey A, Verma AK (2014) Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable  $\beta$ -glucosidase in alginate gel Beads on sugarcane juice. *ISRN biochemistry volume (Article ID 178498)* 8 pages.

[25] Liu D, Zhang R, Yang X, Zhang Z, Song S, Miao Y, Sheng Q (2012) Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. *Microb Cell Fact* 11:25.

[26] Agrawal R, Satlewal A, Verma AK (2012) Development of a  $\beta$ -glucosidase hyperproducing mutant by combined chemical and UV mutagenesis. *Biotech* 3:381–388.

[27] Kitagawa T, Tokuhiko K, Sugiyama H, Kohda K, Isono N, Hisamatsu M, Takahashi H, Imaeda T (2010) Construction of a  $\beta$ -glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. *App Microb Biot* 87 (5): 1841-1853.

[28] Chang J, Park IH, Lee YS, Ahn SC, Zhou Y, Choi YL (2011) Cloning, expression, and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Exiguobacterium* sp. DAU5 and transglycosylation activity. *Biotechnol Bioproc E* 16: 97-106.

[29] Aftab S, Aftab MN, Ikram-Ul-Haq MMJ, Zafar A, Iqbal I (2012) Cloning and expression of endo-1, 4- $\beta$ -glucanase gene from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 into *Escherichia coli* BL21 (DE 3). *Afr J Biotechnol* 11:2846–2854.

## Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)