

# SELECCIÓN DE LEVADURAS AUTÓCTONAS DE LA REGIÓN VITIVINÍCOLA D.O.C. SAN RAFAEL (MENDOZA) PRODUCTORAS DE PECTINASAS ACTIVAS A BAJAS TEMPERATURAS.

MERÍN, M. G.<sup>1,2</sup>, MORATA DE AMBROSINI, V. I.<sup>1,2</sup>.

(1) Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Biología-Alimentación, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, UNCuyo. Bernardo de Irigoyen 375. CP 5600. San Rafael, Mendoza, Argentina. Tel. +54-2627-430673. [mgmerin@fcai.uncu.edu.ar](mailto:mgmerin@fcai.uncu.edu.ar)

(2) CONICET.

## 1- Resumen

Las pectinasas se emplean en la elaboración de jugos de frutas y en el tratamiento de mostos para la fermentación, así como en la clarificación de las bebidas obtenidas. El proceso de vinificación, tan importante para la economía de nuestra región DOC San Rafael (Mendoza), hace uso de esta herramienta a gran escala. Las levaduras son una fuente de producción de enzimas y dado el rol importante que juegan en productos fermentados, investigaciones en sus enzimas pectolíticas serían útiles porque las mismas pueden ser producidas por las levaduras como parte del proceso. Actualmente, se busca que la fermentación alcohólica sea posible a bajas temperaturas ya que esto permite mejorar las características organolépticas de los vinos. Es por ello que el presente trabajo se centró en la búsqueda de levaduras autóctonas capaces de producir enzimas pectinolíticas que actúen a dichas temperaturas.

Para el aislamiento, se tomaron muestras de 11 variedades de uva tintas y blancas de la región DOC San Rafael y se sembraron en tres diferentes medios agarizados: WL, YGC (Merck) y Mosto Uva. Posteriormente, las colonias aisladas se sembraron en un medio especialmente diseñado que contenía pectina como única fuente de carbono para detectar las cepas pectinolíticas en placa a una temperatura de 28°C. La selección se realizó visualizando las colonias crecidas luego del revelado con lugol, detectándose una zona clarificada alrededor de las mismas. De un total de 1023 microorganismos sembrados sobre el medio con pectina, 565 colonias resultaron ser pectinolíticas, de las cuales se seleccionaron 96 cepas de levaduras por presentar mayor diámetro de halo de clarificación. A partir de las mismas, se realizó una selección secundaria, según la capacidad de producir pectinasas activas a bajas temperaturas y crecer rápidamente a dichas temperaturas, por el método en placa de igual forma que en la selección primaria y se incubaron a 12°C. Se escogieron las cepas que presentaron mayor relación diámetro de halo/diámetro de colonia y mayor diámetro de colonia. Resultaron seleccionadas 10 cepas, sobre las que luego se determinó sobre los extractos enzimáticos producidos en medio YEPD-pH 3,5 su actividad pectinolítica por la liberación de azúcares reductores medidos por el método del DNS (ácido 3,5 – dinitrosalicílico). Finalmente, se escogieron las 4 mejores cepas productoras de pectinasas activas a bajas temperaturas, GM-R-2-2, GM-Ch-2-4, GM-PN-3-4 y GM-PN-3-21 con muy buenos niveles de actividad enzimática a dichas temperaturas: 0,751; 0,696; 0,623 y 0,551 UE/ml extracto enzimático, respectivamente. Además, las levaduras produjeron enzimas sin la necesidad de ser inducidas por pectina, por lo que se confirma que son constitutivas.

## 2- Introducción

Las enzimas son herramientas biotecnológicas muy valiosas en la elaboración de alimentos. Particularmente las pectinasas se emplean en muchos procesos industriales, como por ejemplo la extracción, clarificación y reducción de viscosidad en jugos de frutas, extracción de aceites de vegetales y cítricos, fermentación de café y té, entre otras numerosas aplicaciones industriales (Kashyap y col., 2001). Estos compuestos son un complejo enzimático que degradan los polímeros pécticos. Hay diversas clases de enzimas involucradas en la degradación de pectinas: pectin y pectato liasas (PL), pectin metil esterases (PME) y poligalacturonasas (PG) (de Vries y Visser, 2001).

El proceso de vinificación, tan importante para la economía de nuestra región DOC San Rafael (Mendoza), hace uso de las pectinasas, una útil herramienta a gran escala para diferentes propósitos, tanto aumentar el rendimiento en jugo y la extracción de sustancias propias de la baya de uva (polifenoles y compuestos del flavor) como colaborar en el proceso de clarificación y filtración del vino por hidrólisis de la pectina, polisacárido responsable de la turbidez y de la viscosidad.

Las pectinasas disponibles en el mercado y útiles en la vinificación son producidas por hongos, *Aspergillus niger* o *Penicillium notatum* (Kashyap y col., 2001). Sin embargo, estos hongos secretan otras enzimas que son indeseables para la producción de vinos y jugos de fruta, como por ejemplo la arabinofuranosidasa, que puede causar turbidez (Whitaker, 1984). Las levaduras son una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales (Blanco y col., 1999; Jia y Wheals, 2000). Estos organismos presentan ventajas comparadas con los hongos filamentosos respecto a la producción de pectinasas, debido a que son unicelulares, el crecimiento es relativamente simple y casi no liberan metanol tóxico.

En la actualidad, la fermentación alcohólica y la etapa de maceración pre-fermentativa en la elaboración de vinos se desarrollan a bajas temperaturas (10-15°C) para mejorar las cualidades organolépticas del producto, ya que aumenta la producción y retención de compuestos volátiles del flavor, mejorando su perfil aromático (Killian y Ough, 1979; Kunkee, 1984). Además, con la técnica de maceración fría pre-fermentativa se logran vinos más oscuros y vívidos, con menos tonos marrones (Gómez-Míguez y col., 2007). Esta nueva situación en la vinificación requiere tanto para la extracción como para la clarificación, de enzimas pectinolíticas que actúen en ese rango de temperatura.

Hasta la fecha no se encuentran reportes en la literatura de estudios locales de aislamiento y selección de levaduras autóctonas de la región DOC San Rafael, que tengan la capacidad de producir enzimas pectinolíticas activas a bajas temperaturas. Por esta razón, es muy valiosa una búsqueda exhaustiva y una selección cuidadosa de las mejores cepas de levaduras, ya que éstas son útiles para un doble propósito: por un lado para sintetizar y luego purificar las enzimas para adición a los jugos de fruta para aumentar la extracción y clarificación y, por el otro, en el caso de los productos fermentados, las enzimas pueden ser producidas por las levaduras como parte del proceso, además de cumplir con la función primordial que es la fermentación.

## 3- Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue aislar y seleccionar cepas de levaduras autóctonas productoras de pectinasas, a partir de la superficie de bayas de uva del ecosistema DOC San Rafael (Mendoza), activas a bajas temperaturas (10-15°C) y en las condiciones del

proceso industrial de vinificación, con el fin de aplicarlas “in situ” en el proceso de elaboración de vinos tintos.

#### 4- Metodología

*Aislamiento de microorganismos pectinolíticos:* El aislamiento de los organismos productores de pectinasa se realizó a partir de 11 variedades de uva, en estado de madurez, de la región DOC San Rafael, provincia de Mendoza. Se colocaron 10 granos de uva de cada variedad en frascos estériles conteniendo 10 ml de agua peptona (0,1%) estéril. El sistema se sometió a agitación a una velocidad de 165 rpm durante 1 h. Luego, se sembró una alícuota de 200 µl del líquido resultante en tres diferentes medios agarizados, WL (composición [g/litro agua destilada]: Extracto de levadura 4,0; Peptona ácida de caseína, 5,0; D(+)-glucosa, 50,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,55; KCl, 0,425; CaCl<sub>2</sub>, 0,125; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,125; FeCl<sub>3</sub>.3H<sub>2</sub>O, 0,0025; MnSO<sub>4</sub>, 0,0025; Verde de bromocresol, 0,022; Agar-agar, 17,0) pH = 5,5; YGC (Merck) y Mosto Uva (composición [cada 100 ml de agua destilada]: Mosto concentrado, 868g azúcar/litro, 2,3 ml; Extracto de levadura, 1 g; Agar-agar, 2 g) pH = 4,5. Luego, se incubaron a 28°C durante 48 h.

*Selección primaria de levaduras:* Las colonias aisladas anteriormente en cada uno de los tres medios de enriquecimiento, se sembraron sobre un medio especialmente diseñado que contuvo pectina como única fuente de carbono (g/1000 ml de agua destilada): Pectina cítrica, 2; Extracto de levadura, 1; Agar, 15; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2; CaCl<sub>2</sub>, 0,05; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8; MnSO<sub>4</sub>, 0,05; pH = 5. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 48 h. La selección se realizó visualizando las colonias desarrolladas luego del agregado de lugol, detectándose una zona clarificada alrededor de las colonias (Fernandes-Salomão y col., 1996). Se seleccionaron sólo las levaduras que presentaron mayor tamaño de halo de clarificación.

*Selección secundaria de levaduras:* Las cepas seleccionadas precedentemente se sometieron a una segunda selección, según la capacidad de crecer y producir pectinasas a bajas temperaturas (12°C). La misma se llevó a cabo por medio de la determinación en placa, con el medio descrito anteriormente con pectina como única fuente de carbono, y posterior revelado con lugol. Se seleccionaron las mejores cepas según dos criterios, a saber, las que presentaron mayor relación diámetro de halo/diámetro de colonia y las que resultaron con mayor tamaño de colonia aunque con una mediana relación diámetro de halo/diámetro de colonia.

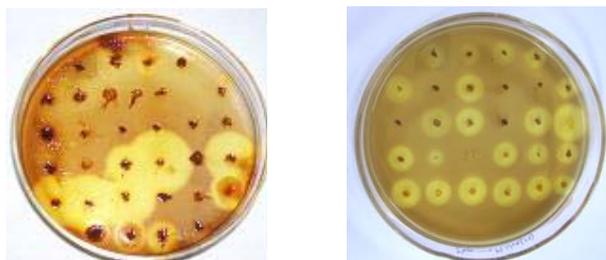
*Obtención de los extractos enzimáticos en las condiciones de vinificación:* Se sembraron las cepas seleccionadas previamente como mejores a 12°C (inóculo al 5%) en caldo YEPD (g/100 ml buffer cítrico-citrato, pH 3,5): D-(+)-Glucosa, 2,0; Peptona de soja, 1,0; Peptona de carne, 1,0; Extracto de levadura, 1,0. Se incubaron a dicha temperatura durante 7 días. Los cultivos se sometieron a agitación a una velocidad de 130 rpm. Luego, los extractos obtenidos se centrifugaron a 5.000 xg durante 15 min y se filtraron a través de una membrana de 0,22 µm de tamaño de poro.

*Evaluación de actividad enzimática en los extractos obtenidos:* Los extractos enzimáticos extracelulares libres de células se utilizaron para la determinación cuantitativa de la actividad pectinolítica a 12°C. La misma fue ensayada por la cuantificación de los azúcares reductores liberados desde una solución de pectina (0,25%

de pectina en buffer cítrico-citrato, pH 3,5) usando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). El ácido galacturónico fue utilizado como estándar (Sigma Chem. Co.). La mezcla de reacción incluyó 0,45 ml de sustrato y 0,05 ml de extracto enzimático. Dichas soluciones se incubaron a 12°C durante 30 min. La determinación se llevó a cabo por triplicado. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones del ensayo.

## 5- Resultados

*Aislamiento y selección primaria de levaduras:* Se sembraron 33 placas conteniendo los tres medios de enriquecimiento definidos anteriormente, en las que se estudió un total de 1023 colonias de microorganismos de la región DOC San Rafael, las que pudieron ser bacterias, hongos o levaduras; 576 procedieron de variedades tintas y 480 de blancas. Del total de microorganismos estudiados resultaron pectinolíticos 565. Previo a la selección se realizó una observación microscópica de los organismos pectinolíticos, para verificar que los mismos fueran hongos unicelulares (levaduras) y descartar a los posibles hongos multicelulares y bacterias. Finalmente, de todos los organismos pectinolíticos se escogieron 96 levaduras pectinolíticas, aquellas que presentaron los mayores tamaños de halos de clarificación (Fig. 1).



**FIGURA 1.** Halos de clarificación de algunos microorganismos pectinolíticos, revelados con lugol.

*Selección secundaria de levaduras:* Las cepas seleccionadas precedentemente se sometieron a una segunda selección a 12°C. Para ello se sembraron por punción aproximadamente 20 cepas de levaduras por placa. Luego del tiempo de incubación correspondiente, se determinó la relación entre el tamaño de halo y el tamaño de colonia (Dh/Dc) de cada cepa (Fig. 2). Las relaciones Dh/Dc resultantes estuvieron comprendidas en un rango de 1,5 - 6,0 unidades.



**FIGURA 2.** Selección secundaria. Halos de clarificación de algunas cepas pectinolíticas de levaduras, revelados con lugol.

Finalmente, resultaron escogidas 10 cepas de levaduras a 12°C (Tabla 1 y 2); 5 de ellas se eligieron por su capacidad de producción de pectinasas, originando las mayores relaciones Dh/Dc. Las restantes 5 cepas se seleccionaron por su capacidad de crecimiento (Dc), lo que da lugar una relación Dh/Dc mediana. Aquí vale aclarar que, este último criterio de selección se basa en la aplicación industrial de las cepas, ya que no sólo es importante la producción de enzimas sino también el crecimiento rápido y significativo, debido a que se desea la producción de las pectinasas *in situ* en el proceso de vinificación; por lo tanto es una condición primordial que las levaduras seleccionadas puedan crecer, multiplicarse, para finalmente producir el metabolito de interés.

**TABLA 1:** Cepas de levaduras seleccionadas a 12°C con mayor relación Diámetro de halo/Diámetro de colonia (Dh/Dc).

Cepa	Diámetro de halo (mm)	Diámetro de colonia (mm)	Relación Dh/Dc
GM-PN-3-21	21	3,5	6,00
GM-Ma-1-6	11	2,5	4,40
GM-PN-3-4	19	4,5	4,22
GM-PN-2-2	21	5	4,20
GM-CS-1-23	12	3	4,00

**TABLA 2:** Cepas de levaduras seleccionadas a 12°C con buen crecimiento (Dc).

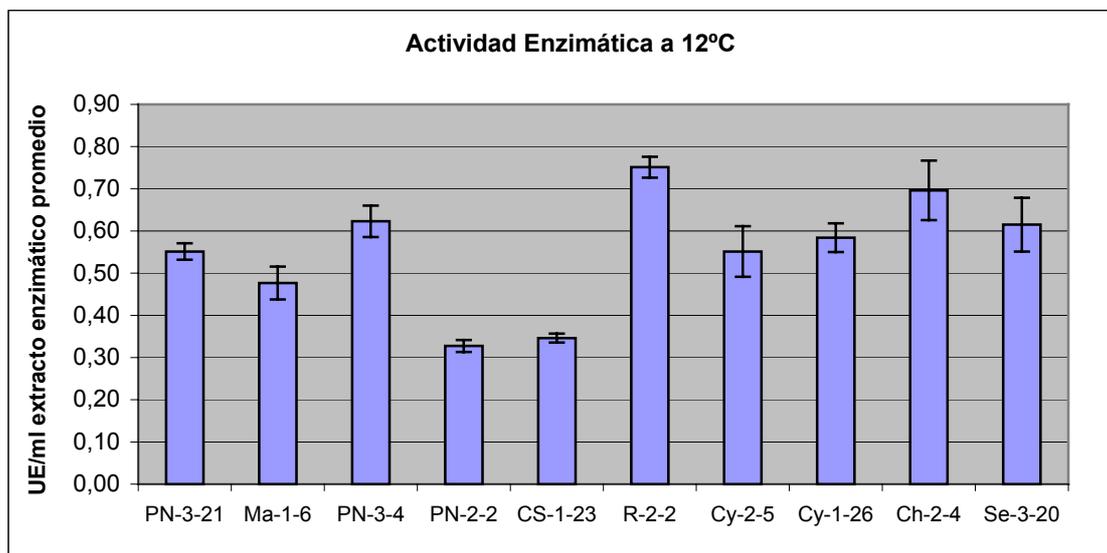
Cepa	Diámetro de halo (mm)	Diámetro de colonia (mm)	Relación Dh/Dc
GM-R-2-2	19	6	3,17
GM-Cy-2-5	17	6	2,83
GM-Cy-1-26	19	7	2,71
GM-Ch-2-4	14,5	7	2,07
GM-Se-3-20	18	9	2,00

*Determinación de la actividad enzimática en los extractos obtenidos:* Las 10 cepas de levaduras escogidas en la etapa anterior, se ensayaron a 12°C y se seleccionaron las que presentaron mayor actividad pectinolítica, determinada con el método del DNS, como se puede observar en la Fig. 3. Aquí, es necesario remarcar que se plantea este método como parte de la selección secundaria debido a que la técnica en placa tiene una limitación que es la difusión de la enzima a través del medio sólido donde se encuentra el polímero a degradar. Por lo tanto, es importante realizar un análisis en medio líquido, donde se encuentre el sustrato y la enzima. Así, esta técnica se aplica para aumentar la sensibilidad de la selección.

Las cepas de preferencia resultaron ser 4; 2 provenientes del conjunto de cepas de mayor relación Dh/Dc y 2 del grupo de buen crecimiento. Las cepas que tuvieron mayor actividad pectinolítica por el método del DNS, resultaron ser prácticamente todas aquellas seleccionadas por el método en placa como de buen crecimiento. Esto apoya la decisión tomada de realizar ensayos complementarios en medio líquido para escoger finalmente a las mejores cepas productoras de pectinasas. Por lo tanto, se seleccionaron las cepas GM-PN-3-4 y GM-PN-3-21, con una actividad enzimática de 0,623 y 0,551 UE/ml extracto enzimático, respectivamente. Mientras que las cepas escogidas por su

buen crecimiento en placa que exhibieron mayor actividad en medio líquido fueron: GM-R-2-2 y GM-Ch-2-4, con una actividad enzimática de 0,751 y 0,696 UE/ml extracto enzimático, respectivamente (Fig. 3).

**FIGURA 3:** Actividad pectinolítica de las cepas seleccionadas a 12°C, determinadas por el método del DNS.



Investigaciones sobre levaduras pectinolíticas realizadas por otros autores arrojaron valores de actividad enzimática, medida por el método del DNS en los sobrenadantes de cultivos, desde 0,107 hasta 0,679 UE/ml, a pH 5,0 y 50°C (Oliveira y col., 2005). Mientras que Blanco y col. (2002) estudiaron la actividad PG de cepas indígenas y mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 y resultaron valores dentro del rango 0,103-0,974 UE/ml, a 37°C y pH 5,2. En conclusión, la actividad pectinolítica producida con las cepas propias activas a 12°C y pH 3,5 es comparable con actividades a 50°C y 37°C, a pH 5,0 y 5,2 respectivamente, en los trabajos citados, revelando que las cepas seleccionadas en el presente estudio tienen muy buenos niveles de actividad a bajas temperaturas y en medio muy ácido (pH del mosto corregido).

Asimismo, debido a que el medio de cultivo utilizado para la obtención del extracto enzimático no contuvo pectina, sino glucosa como única fuente de carbono, se concluye que la producción de enzima no es inducible y, por lo tanto, las levaduras seleccionadas son constitutivas. De este modo, la producción enzimática industrial no estará sujeta a las condiciones ambientales.

En investigaciones futuras, se identificarán las cepas pectinolíticas por medio de ensayos morfológicos y bioquímicos y por técnicas moleculares, y se caracterizará su sistema pectinolítico, con el objetivo final de estudiar la factibilidad de incorporación de dichas levaduras a los cultivos iniciadores para vinificación, para aplicarlas en las etapas de maceración pre-fermentativa y/o fermentación. Además, existe la posibilidad de que dichas cepas puedan usarse en diferentes industrias de alimentos.

## 6- Conclusiones

El presente trabajo es el primer reporte sobre selección de cepas pectinolíticas de levaduras del ecosistema DOC San Rafael. Se han logrado seleccionar 4 cepas de levaduras productoras de pectinasas a 12°C con un importante crecimiento en las condiciones del proceso de vinificación y muy buenos niveles de actividad enzimática, considerando que son extractos crudos, no sometidos a concentración ni purificación.

Las cepas de levaduras seleccionadas son constitutivas. Esta es una importante característica que significa una ventaja industrial, debido a que la producción enzimática no está sujeta a las condiciones ambientales.

Se ha realizado una búsqueda exhaustiva y aislamiento de levaduras pectinolíticas; por lo que se cuenta con un importante número de cepas que no fueron seleccionadas según los criterios planteados en este trabajo, pero que en futuras investigaciones pueden seguir estudiándose para seleccionar levaduras con alguna finalidad específica.

## 7- Bibliografía

- Blanco, P., Sieiro, C., Villa, T. G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 1-9.
- de Vries, R.P. and Visser, J. (2001) *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497-522.
- Fernandes-Salomão, T. M.; Rodrigues Amorim, A. C.; Chaves-Alves, V. M., Cavalcante Coelho, J. L; Olzany Silva, D; Fernandes de Araújo, E. (1996). Isolation of pectinase Hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 27, 15-18.
- Gómez-Míguez, M.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. (2007). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79, 271-278.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdallah, F. and Gargouri, A. (2002) Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enz. Microb. Tech.* 30, 662–666.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004) The RhaS activator controls the *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes rhiN, rhiT and rhiE involved in rhamnogalacturonan catabolism. *Mol. Microbiol.* 51, 1361–1374.
- Jia, J.H. and Wheals, A. (2000) Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* 38, 264–270.
- Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77, 215-227.
- Killian, R.E.; Ough, C.S. (1979). Fermentation esters-formation and retention as affected by fermentation temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 30, 301-305.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Oliveira, K. F., Malavolta, L., Souza, C. S., Vicente, E. J., Laluce, C. (2005). Pectinolytic activity secreted by yeasts isolated from fermented citrus molasses. *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.
- Prade, R.A., Zhan, D.F., Ayoubi, P. and Mort, A.J. (1999) Pectin, pectinases and plant-microbe interactions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16, 361-391.
- Schwan, R.F., Cooper, R.M. and Wheals, A.E. (1997) Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enz. Microb. Tech.* 21, 234–244.
- Whitaker, J. R. (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microbiology and Technology*, 6, 341-349.