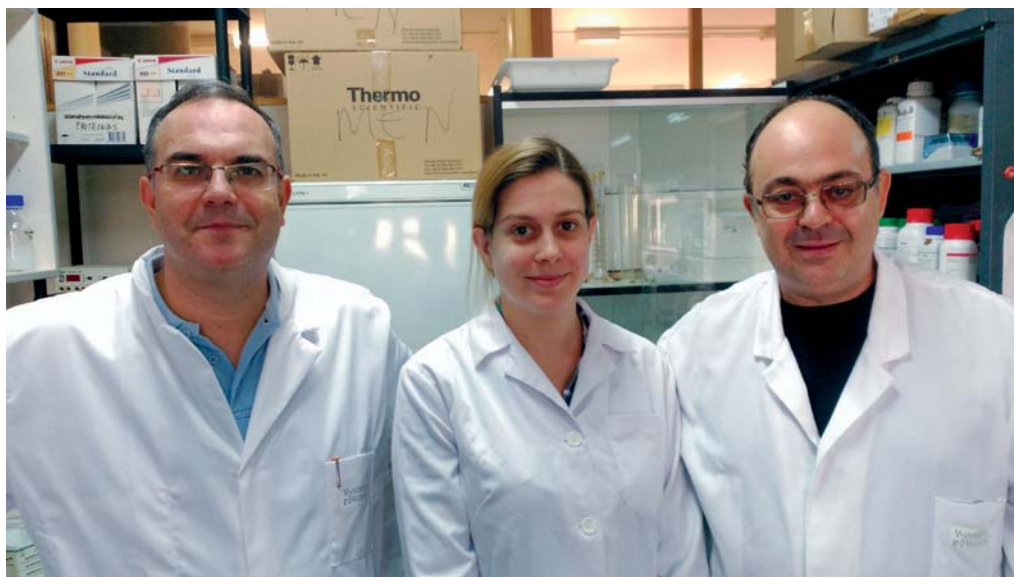


## Levaduras no-*Saccharomyces*: un universo por explorar

J.J. Mateo



Departament de Microbiologia i Ecologia. Universitat de València



Algunos de los miembros del grupo de investigación "Micología Enológica" (de izquierda a derecha): Sergi Maicas, Rosa Isabel Ferragut, José Juan Mateo.

El grupo de Microbiología Enológica se constituyó como tal dentro del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia en el año 1986. En este sentido se han investigado tanto aspectos beneficiosos de ciertos microorganismos eucariotas como aspectos perjudiciales. Esta doble vertiente investigadora nos ha permitido la acogida en nuestro grupo de varios alumnos colaboradores interesados en la Microbiología de los Alimentos, algunos de los cuales han desarrollado o están desarrollando dentro de nuestra línea de investigación su proyecto de licenciatura. Del mismo modo, en el seno de nuestro grupo han trabajado y trabajan estudiantes de otros países mediante becas del Programa ERASMUS.

Nuestro grupo realizó los primeros estudios sobre las levaduras de mostos y vinos en diferentes zonas de la Comunidad Valenciana; estos estudios se vieron completados posteriormente con análisis de los componentes fermentativos de la fracción volátil del vino.

Como consecuencia de estos estudios, se publicaron las primeras indicaciones acerca de la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* en la mejora de la calidad de los vinos. Fruto de estos estudios se puso de manifiesto la importancia de los componentes pre-fermentativos en el aroma de algunos vinos, por lo cual se solicitó la colaboración del Dr. Rocco di Stefano para conocer la metodología necesaria para el estudio de estos componentes, tanto en su forma libre como en forma glicosilada. A continuación nos planteamos la búsqueda de estas actividades enzimáticas en levaduras, encontrándose que se podían inducir en algunas cepas de *S. cerevisiae*. Este trabajo nos permitió alcanzar conocimientos suficientes para detectar las actividades enzimáticas de interés en el presente proyecto, así como para su purificación y caracterización.

Desde el punto de vista tecnológico, algunas características de las cepas no-*Saccharomyces* podrían justificar su utilización en la

producción industrial de vinos más aromáticos. Nuestros estudios nos han permitido observar que varias especies de levaduras no-*Saccharomyces* poseen actividades glicolíticas. La puesta a punto de la metodología analítica permite la correcta cuantificación de las actividades  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa. La inducción de ambas actividades mejora cuando se emplea xilano como inductor. La concentración mínima de inductor que permite obtener la actividad máxima es del 4 % (p/v). Las condiciones óptimas de bioproducción implican el empleo de YNB 1.34 % (p/v) como medio basal, un periodo de inducción de 48 horas y una concentración inicial de inóculo de  $10^6$  células/ml.

Partiendo de 43 aislados de levaduras vínicas no-*Saccharomyces*, se han seleccionado cuatro por presentar valores más elevados de actividades  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa. En todos los casos, la actividad  $\beta$ -glucosidasa presenta unos valores de pH y temperatura óptimos de 6.0 y 40°C respectivamente.

Cabe destacar que esta actividad en uno de los aislados se ve poco afectada por el pH. Respecto a la actividad  $\beta$ -xilosidasa, dos aislados del género *Hanseniaspora* presentan un pH óptimo de 6.0, mientras que los otros dos (del género *Pichia*) tienen un valor de 5.0; la temperatura óptima es de 40°C. Las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa presentan un elevado interés biotecnológico debido a su resistencia a compuestos inhibitorios presentes en el mosto/vino (glucosa, fructosa, sacarosa, metanol y etanol). En cuanto a la influencia a diferentes factores abióticos, la actividad  $\beta$ -glucosidasa no se incrementa con ninguno de ellos. La actividad  $\beta$ -xilosidasa es activada, en mayor o menor medida, por el  $\beta$ -mercaptoetanol y el EDTA. Otros compuestos como el SDS y el  $Mg^{2+}$  actúan como activadores de la  $\beta$ -xilosidasa solamente en algunos de los aislados estudiados.

La levadura *Wickerhamomyces anomalus* es la adecuada para los estudios de caracterización enzimática, ya que todos los aislados de esta especie han mostrado todas las actividades enzimáticas ensayadas. Uno de ellos, de manera individual, presenta mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa, xilanasas y lipasa que el resto de aislados. Dado el interés industrial que presentan dichas actividades, representa asimismo un buen candidato para profundizar en su estudio.

Los ensayos enzimáticos realizados dentro del género *Hanseniaspora* muestran que las enzimas  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y proteasa son las que presentan mayor actividad. Las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa mostraron tolerancia a niveles elevados de etanol, que fue mayor que la resistencia a la glucosa, por lo que estas enzimas podrían ser más efectivas en vino que en mosto.

Se procedió a la purificación y caracterización de una enzima con actividad 1,4- $\beta$ -D-xilosidasa a partir de un aislado de *P. membranifaciens*, mediante la utilización de una columna de intercambio catiónico DEAE-Sephrose a valores de pH ligeramente ácidos (5,5-7,0). La 1,4- $\beta$ -D-xilosidasa de *P. membranifaciens* muestra un pH óptimo de 6.0. La temperatura a la que detectamos un mayor nivel de actividad (30°C) se encuentra asimismo dentro del rango de

temperaturas determinado para otras levaduras como *Candida utilis*. Respecto a la influencia de los componentes del mosto de uva ensayados sobre la actividad enzimática, es de destacar que solamente la glucosa ejerce una influencia claramente negativa sobre la misma, pero mantiene una actividad superior al 50%, con una concentración de este azúcar superior a 1 M. Asimismo, se observa un incremento en la actividad de la enzima a concentraciones bajas de etanol, alcanzándose el máximo con un 5 % (v/v) y no se ve afectada a elevadas concentraciones de etanol.

Las proteasas de las levaduras juegan un papel relevante durante el proceso de la autólisis en la guarda de los vinos con las lías durante el envejecimiento y en el enturbiamiento de carácter proteico (quebra proteica), especialmente en los vinos blancos. Sin embargo, debido a las particulares condiciones del vino, sólo algunas proteasas son activas, y en este sentido hemos investigado la acción de las proteasas de las levaduras no-*Saccharomyces* sobre la hidrólisis de las proteínas del vino, demostrando la importancia que tienen las fuentes de nitrógeno sobre la producción de proteasas extracelulares.

Hemos observado que las levaduras aisladas en ecosistemas vínicos eran capaces de producir las actividades enzimáticas necesarias para realizar el tratamiento de los residuos de la industria agroalimentaria. El aislamiento y caracterización de algunos aislados productores de  $\beta$ -glucosidasas nos permite disponer de una batería de levaduras capaces de liberar compuestos fenólicos. Esta acción resulta interesante en la industria alimentaria al posibilitar la reducción del amargor del aceite de oliva. Asimismo, y desde un punto de vista medioambiental, estos aislados posibilitan el proceso de biorremediación de alpechines producidos por la industria del aceite de oliva. El uso de técnicas moleculares nos ha permitido agrupar e identificar las levaduras aisladas de alperujo de manera sencilla y rápida. Hemos descrito la presencia de *Candida norvergica* en este tipo de sustrato y de *C. molendinolei* y *C. adriatica*. Los porcentajes de inhibición en el crecimiento de hongos obtenidos para algunos de nuestros aislados los podría situar como candidatos para

convertirse en agentes de control biológico frente a patógenos fúngicos de vegetales. Los resultados presentados en este trabajo abren la puerta al uso de algunos de estas levaduras aisladas en seguridad alimentaria por su acción tanto sobre el crecimiento de *A. parasiticus* como sobre las aflatoxinas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Mateo JJ, Jiménez M, Huerta T y Pastor A** (1991) Contribution of different yeasts isolated from musts of Monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 153-160.
- Gil JV, Mateo JJ, Jiménez M, Pastor A y Huerta T** (1996) Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61, 1247-1250.
- Mateo JJ, Gentilini N, Huerta T, Jiménez M y Di Stefano R** (1997) Fractionation of glycosylated aroma precursors of grapes and wines. *J. Chromatogr. A* 778, 219-224.
- Mateo JJ y Di Stefano R.** (1998) Description of the  $\beta$ -glucosidase activity of wine yeasts *Food Microbiol.* 14, 583-591.
- Mateo JJ y Jiménez M.** (2000) Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr. A* 881, 557-567.
- Maicas S y Mateo JJ.** (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 322-35.
- Mateo JJ, Peris L, Ibañez C y Maicas S.** (2011) Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 347-354.
- Lopez S, Mateo JJ y Maicas S.** (2014) Characterization of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma enhancing properties in Muscat wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 35, 292-303.
- Madrigal T, Maicas S y Mateo JJ.** (2013) Glucose and ethanol tolerant enzymes produced by *Pichia* (*Wickerhamomyces*) isolates from enological ecosystems. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 126-33.
- Lilao J, Mateo JJ y Maicas S.** (2015) Biotechnological activities from yeasts isolated from olive oil mills. *Eur. Food Res. Technol.* 240,357-365.
- López MC, Mateo JJ y Maicas S.** (2015) Screening of  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase activities in four non-*Saccharomyces* yeast isolates. *J. Food Sci.* 80, 1696-1704.
- Mateo JJ, Maicas S y Thieffen C.** (2015) Biotechnological characterisation of exocellular proteases produced by enological *Hanseniaspora* isolates. *Int. J. Food Science Technol.* 50, 218-225.
- Mateo JJ y Maicas S.** (2015) Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Res. Int.* 73, 13-25.
- Lopez S, Mateo JJ y Maicas S.** (2016) Screening of *Hanseniaspora* strains for the production of enzymes with potential interest for winemaking. *Fermentation* 2, 1; doi: 10.3390/fermentation2010001.
- Mateo JJ y Maicas S.** (2016) Application of non-*Saccharomyces* yeasts to wine-making process. *Fermentation* 2, 14; doi:10.3390/fermentation2030014.