

ACTIVIDADES GLICOSIDASICAS EN LEVADURAS PATAGONICAS DE ORIGEN ENOLOGICO

María E. Rodríguez, Christian Lopes, Salvador Vallés, María van Broock, Daniel Ramón y Adriana Caballero. Lab. de Microbiología y Biotecnología- Facultad de Ingeniería- Universidad Nacional del Comahue. cc. 790, 8300 Neuquén, Argentina. e-mail: erodrig@uncoma.edu.ar.

Palabras clave: glicosidasas, aroma, vinos

Introducción. El aroma y el color son dos cualidades importantes del vino. La incidencia de los monoterpenos libres en sul aroma varietal está actualmente bien establecida; no obstante en el jugo de uva una gran proporción de estos terpenos se encuentran bajo la forma de conjugados no volátiles e inodoros, β -D-glucopiranosidos y diglicósidos, desde donde pueden ser liberados enzimáticamente por glicosidasas. Actualmente la presencia de este tipo de actividades es utilizada como criterio de selección de cepas de levaduras para cultivos iniciadores vínicos.

En el presente trabajo se determinó la actividad de cuatro glicosidasas, β -glucosidasa, β -xilosidasa, α -arabinofuranosidasa y α -ramnosidasa, en levaduras indígenas aisladas de uvas y mostos tintos de la región del Comahue, Patagonia Argentina. El objetivo final es la selección de cepas de levaduras autóctonas para cultivos iniciadores para vinificación.

Metodología Las levaduras fueron aisladas de superficie de uvas tipo Merlot, Malbeck y Trosseau y de sus mostos de fermentación espontáneos. Identificación taxonómica (a nivel de género): se realizó mediante pruebas morfológicas y fisiológicas según métodos y claves propuestos por Kreger-van Rij, 1984. Detección de la actividad β -glucosidasa: se realizó por siembra en estría de los aislamientos en tubos de YNB-agar utilizando arbutina como sustrato y revelado por cambio de coloración del medio (1). Las levaduras que presentaron una actividad importante fueron seleccionadas y sus identidades a nivel de especie determinadas mediante el análisis de RFLPs de la región ITS1-5.8SrRNA-ITS2 amplificada por PCR (2). Detección de actividades glicosidásicas: α -ramnosidasa (α RH), α -arabinofuranosidasa (α ARF), β -xilosidasa (β XL) y β -glucosidasa (β GL), el ensayo se llevo a cabo en YNB-agar con arabinosa, arabitol, celobiosa, glucosa, ramnosa y xilosa como fuentes carbonadas y como sustratos se utilizó el 4-methylumbelliferyl-glicosido correspondiente para cada enzima. La actividad enzimática fue visualizada como halos fluorescentes alrededor de las colonias por exposición a luz UV (3) (Figura 1).



Figura 1: Monitoreo en placa de actividades glicosidásicas. Aislamiento de *C. guilliermondii* con actividad ramnosidásica

Resultados y discusión. Los 170 aislamientos de levaduras taxonómicamente caracterizados se distribuyeron entre 4 géneros: *Saccharomyces* (67), *Kloeckera* (23), *Torulaspora* (6) y *Candida* (74). Sólo 38 aislamientos (22%) presentaron actividad β -glucosidasa en los ensayos con arbutina. Este ensayo permitió finalmente seleccionar 12 aislamientos: *C. guilliermondii* (6), *C.*

pulcherrima (2) y *K. apiculata* (4) (Figura 2). Ninguno de los aislamientos de *Saccharomyces* monitoreados presentó actividad β -glucosidasa.

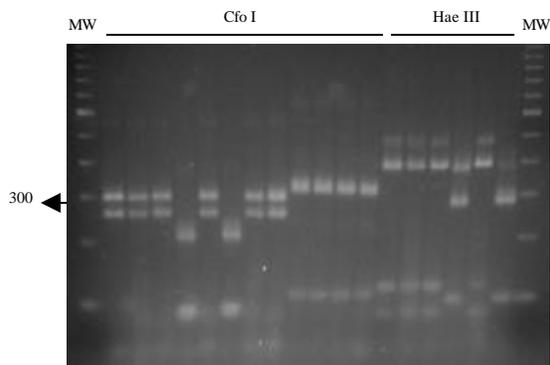


Figura 2: RFLP-PCR de la región del rDNA de levaduras vínicas. Calles 2,3,4,6,8 y 9 *C. guilliermondii*; calles 5 y 7 *C. pulcherrima* y calles 10,11,12,13 *K. apiculata* MW: marcadores de peso molecular

Los doce aislamientos seleccionados y caracterizados presentaron perfiles de actividades glicosidásicas diferenciales que permitió clasificarlos en cinco grupos (Tabla 1)

Tabla 1: Caracterización preliminar de actividades glicosidásicas

| Grupo | α RH | α ARF | β XL | β GL | Especies | n |
|-------|------------------|--------------|------------------|------------------|--------------------------|---|
| I | (-) | (-) | (+) | (+) | <i>C. guilliermondii</i> | 5 |
| II | (+) ^a | (-) | (+) | (+) | <i>C. guilliermondii</i> | 1 |
| III | (-) | (-) | (+) ^b | (+) ^b | <i>C. pulcherrima</i> | 2 |
| IV | (-) | (-) | (-) | (+) | <i>K. apiculata</i> | 2 |
| V | (-) | (-) | (-) | (+) ^c | <i>K. apiculata</i> | 2 |

n: número aislamientos; a: inducible por ramnosa; b: inhibibles por xilosa c: inducible por celobiosa;

Conclusiones.

- Todas las levaduras que presentaron alguna actividad glicosidásica fueron no-*Saccharomyces*.
- La levadura perteneciente al grupo II podría tener mayor capacidad de potenciar el aroma varietal del vino debido a que adicionalmente a la presencia de β -glucosidasa presenta actividad α -ramnosidasa, capaz de hidrolizar diglicósidos.

Bibliografía

1. Rosi I., Vinella M. y Domizio P. (1994). Caracterización de β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 519-527.
2. EsteveZarzoso B., Belloch C., Uruburu F. y Querol A. (1999). Identificación de levaduras por RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. System. Bacteriol.* 49: 329-337.
3. Manzanares P., Ramón D. y Querol A. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β -D-xylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 105-112