

TESIS DE GRADO - LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

# **SCREENING DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN LEVADURAS CON POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO**

KARINA ELIZABETH TRUJILLO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO  
Provincia de Mendoza, Argentina

Mendoza, 04 de abril de 2023



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE  
**CIENCIAS  
AGRARIAS**



# SCREENING DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN LEVADURAS CON POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO

Tesista:

Brom. Karina Elizabeth Trujillo  
karinaetrujillo@hotmail.com

Director de tesis:

Dra. Maria Cecilia Rojo  
rojo.cecilia@inta.gob.ar

Co-Director de Tesis:

Dra. Mariana Combina  
combina.mariana@inta.gob.ar

Presidente Comité evaluador:

MSc. Lic. Brom. María Laura Sanchez

Vocales:

Bqca. Silvina Farrando  
Lic. Brom. Marcela Santana

Suplente:

Lic. Brom. Marcela Bernardi

## RESUMEN

Con el objetivo de contribuir a la caracterización y selección de levaduras con capacidad de degradar sustratos lignocelulósicos, como el orujo de uva, se evaluó el perfil de producción de enzimas de dichos microorganismos. Se emplearon 16 levaduras aisladas de etapas tempranas de la fermentación de orujos de uva y 14 pertenecientes a la Colección de Microorganismos de INTA Mendoza (CoMIM). La determinación cualitativa se realizó mediante replica plate en medios inductores específicos para cada actividad enzimática (celulasa,  $\beta$ -glucosidasa, celobiasa, pectinasa y xilanasa). Los resultados del ensayo, mostraron que las cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* sólo expresaron actividad celobiasa (16,7%) en las condiciones del ensayo. En tanto que las cepas no identificadas, que de acuerdo a su morfología macro y microscópica se presuponen dentro del grupo no *Saccharomyces*, presentaron diversas actividades enzimáticas y en algunos casos más de una actividad enzimática para cada aislado. El mayor porcentaje de levaduras presentó actividad celobiasa (76,7 %), el 40 % de las levaduras presentaron actividad  $\beta$ -glucosidasa, el 6,7 % mostraron actividad celulasa, y sólo el 3,3 % expresó la actividad de la enzima pectinasa. Para ninguno de los dos grupos, la actividad de la enzima xilanasa fue positiva (0 %). El 53% de los aislados (16 cepas) presentaron solo una actividad enzimática, correspondiente a la secreción de enzima celobiasa en todos los casos. El 30% conformado por 9 cepas, fueron capaces de expresar dos actividades enzimáticas:  $\beta$ -glucosidasa y celobiasa. El 10%, correspondiente a 3 cepas presentaron tres actividades enzimáticas, dos de ellas secretaron celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y celobiasa, y una de ellas pectinasa en lugar de celulasa. Por último, el 7% restante, no evidenció la expresión de ninguna actividad enzimática. En conclusión, el espectro enzimático más amplio fue detectado en los aislamientos no-*Saccharomyces*. Es por ello, que se seleccionaron tres cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, aún no identificadas, para seguir siendo evaluadas ya que expresaron la actividad de tres enzimas, y son potenciales a ser utilizadas en degradación de biomasa lignocelulósica.

**PALABRAS CLAVE:** Actividad enzimática – Levaduras – Orujo de uva

## ABSTRACT

In order to contribute to the characterization and selection of yeasts capable of degrading lignocellulosic substrates, the enzyme production profile of these microorganisms was evaluated. 16 yeasts isolated from early stages of grape pomace fermentation and 14 belonging to the Collection of Microorganisms of INTA Mendoza (CoMIM) were used. The qualitative determination was made by replica plate in specific inducing media for each enzymatic activity (cellulase,  $\beta$ -glucosidase, cellobiase, pectinase and xylanase). The test results showed that the strains identified as *Saccharomyces cerevisiae* only expressed cellobiase activity (16.7%) under the test conditions. While the unidentified strains, which according to their macro and microscopic morphology are presumed within the non-*Saccharomyces* group, presented various enzymatic activities and in some cases more than one enzymatic activity for each isolate. The highest percentage of yeasts presented cellulase activity (76.7%), 40% of yeasts presented  $\beta$ -glucosidase activity, 6.7% showed cellulase activity, and only 3.3% expressed cellulase activity. pectinase enzyme. For neither of the two groups, the xylanase enzyme activity was positive (0%). 53% of the isolates (16 strains) presented only one enzymatic activity, corresponding to the secretion of cellobiase enzyme in all cases. 30%, made up of 9 strains, were capable of expressing two enzymatic activities:  $\beta$ -glucosidase and cellobiase. 10%, corresponding to 3 strains, presented three enzymatic activities, two of them secreted cellulase,  $\beta$ -glucosidase and cellobiase, and one of them pectinase instead of cellulase. Finally, the remaining 7% did not show the expression of any enzymatic activity. In conclusion, the broadest enzymatic spectrum was detected in the non-*Saccharomyces* isolates. For this reason, three non-*Saccharomyces* yeast strains, not yet identified, were selected for further evaluation, since they expressed the activity of three enzymes, and are potential to be used in degradation of lignocellulosic biomass.

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres, Gladys y Roberto, por darme la vida, inculcarme los valores que hoy me definen, por darme la oportunidad de estudiar, por apoyarme y acompañarme en cada paso que doy.*

*A mis hermanos y amigos, por caminar a mi lado, por entender mi ausencia en época de exámenes, por celebrar mis logros y alentarme en los momentos difíciles.*

*A mis compañeros y amigos de la universidad, en especial a Pilar, por las horas de estudio y las charlas compartidas entre mates que hicieron de mi paso por la facu una experiencia inolvidable.*

*A Vivi por proponerme retomar juntas la última etapa de la carrera y a Caro por alentarme a empezar la tesis.*

*A la Facultad de Ciencias Agrarias, por formarme profesionalmente.*

*A Cecilia y Mariana, directora y codirectora de tesis por brindarme con tanta calidez sus conocimientos, tiempo y paciencia.*

## INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Bioetanol 1G y 2G.....	1
1.2. Composición química de la biomasa lignocelulósica.....	1
1.2.1. Celulosa.....	2
1.2.2. Hemicelulosa.....	4
1.2.3. Lignina.....	5
1.2.4. Compuestos minoritarios.....	6
1.2.5. Pectinas.....	6
Figura 6. Hidrólisis enzimática de polisacáridos pécticos (ácido poligalacturónico) por acción de enzimas pectinolíticas.....	7
1.3. Biomazas lignocelulósicas que se utilizan para la producción de bioetanol 2G.....	7
1.3.1. Orujo de uva.....	7
1.4. Etapas para la conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol.....	9
1.4.1. Importancia de enzimas en la degradación de material lignocelulósico.....	10
1.5. Levaduras productoras de enzimas.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo general.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. HIPÓTESIS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. Microorganismos evaluados.....	13
4.2. Crecimiento de levaduras y preparación de inóculos.....	14
4.3. Detección de actividades enzimáticas de interés.....	14
4.3.1. Actividad celulasa.....	15
4.3.2. Actividad $\beta$ -glucosidasa.....	15
4.3.3. Actividad celobiasa.....	15
4.3.4. Actividad xilanasa.....	15
4.3.5. Actividad pectinasa.....	16
4.3.6. Control negativo.....	16
4.3.7. Control positivo.....	16
4.4. Evaluación de resultados y selección de levaduras.....	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
6. CONCLUSIONES.....	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición porcentual de orujos de uva tinta y blanca. (Fuente: Corbin y col., 2015).....	9
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos a partir de los cuáles se obtienen enzimas celulósicas y/o hemicelulósicas. (Fuente: Sanchez Riaño y col., 2010).....	10
<b>Tabla 3.</b> Aplicaciones de las enzimas en diferentes áreas industriales (Fuente: Singhanía y col, 2013).....	11
<b>Tabla 4.</b> Cepas de levaduras empleadas en el <i>screening</i> de actividades enzimáticas. ....	13
<b>Tabla 5.</b> Perfiles de actividades enzimáticas de aislamientos de levaduras enológicas. ....	18

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del material lignocelulósico en la que se señala a la celulosa de color verde, hemicelulosa de color amarillo y a la lignina en enlaces. Figura extraída de Ribeiro y col. (2016).....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular de la celulosa.....	3
<b>Figura 3.</b> Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	4
<b>Figura 4.</b> Estructura de la hemicelulosa.....	5
<b>Figura 5.</b> Estructura molecular de la lignina.....	6
Figura 6. Hidrólisis enzimática de polisacáridos pécticos (ácido poligalacturónico) por acción de enzimas pectinolíticas.....	7
<b>Figura 7.</b> A) Peine para <i>replica plate</i> . B) Placa multipocillo.....	14
<b>Figura 8.</b> Actividad celulasa en medio YPD e YPGE adicionados con CMC.....	19
<b>Figura 9.</b> Actividad $\beta$ -glucosidasa en medio YNB con arbutina.....	20
<b>Figura 10.</b> Actividad celobiasa en medio YNB con celobiosa.....	21
<b>Figura 11.</b> Actividad xilanasa en medio YPGE adicionado de RBB-Xylan.....	22
<b>Figura 12.</b> Actividad pectinasa en medio Agar poligalacturonato.....	22
<b>Figura 13.</b> Colonias de levaduras en medio YPD (control positivo).....	24
<b>Figura 14.</b> Número y porcentaje de cepas que presentaron de 0 a 4 actividades enzimáticas.....	24

## 1. INTRODUCCIÓN

La energía es un recurso estratégico para el desarrollo socio-productivo de un país. La matriz energética Argentina está constituida por gas natural (53%), petróleo (36%) y las energías renovables con sólo un 11% donde se incluyen la energía hidráulica, eólica, solar y los biocombustibles (4%) (Secretaría de Energía, 2021). Debido a la limitante de los recursos no renovables, es necesario desarrollar conocimiento y tecnología para la generación de energía renovable. Una alternativa promisoría, teniendo en cuenta la capacidad de producción que posee nuestro país en todas sus áreas geográficas, es la transformación de biomasa lignocelulósica en biocombustibles, con la posibilidad de agregar valor en origen, generar puestos de trabajo y contribuir a la sostenibilidad y sustentabilidad de las economías regionales. Asimismo, en los últimos años ha cobrado suma importancia la reducción del impacto ambiental ocasionado por la emisión de gases de efecto invernadero de las diferentes actividades productivas. Por otro lado, dependiendo de la calidad y cantidad, el bioetanol de segunda generación producido puede destinarse a la diversificación de la matriz energética, a industrias farmacéuticas o cosméticas aportando etanol de origen natural.

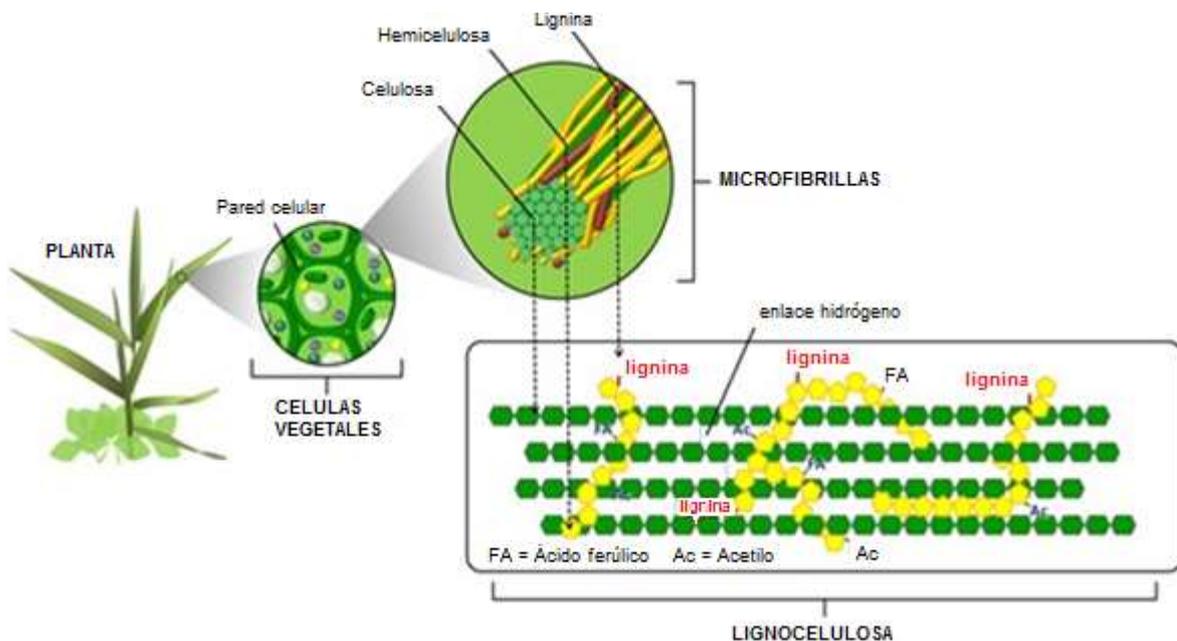
### 1.1. Bioetanol 1G y 2G

El bioetanol que se produce a partir de materia prima comestible, como caña de azúcar (azúcares) y maíz (almidón), se conoce como etanol de "primera generación" (1G). Debido a que la materia prima utilizada para su producción también se destina a alimentación humana, su uso es controvertido (Islam y col., 2015). Para superar dicha limitación se introdujo el concepto de bioetanol de "segunda generación" (2G) basado en el uso de la biomasa lignocelulósica, no comestible, como son los residuos agrícolas o agroindustriales y los cultivos denominados energéticos, cuya materia prima contiene una gran cantidad de azúcares en forma de polisacáridos (Favaro y col., 2013; Islam y col., 2015; Robak y Balcerek, 2018).

### 1.2. Composición química de la biomasa lignocelulósica

La biomasa es todo material biológico derivado de los organismos vivos. En el contexto de la biomasa lignocelulósica que se utiliza para energía a menudo se trata de material de origen vegetal que puede provenir de la biomasa natural producida por ecosistemas naturales, residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial y de la producida a partir de cultivos energéticos que son aquellos dedicados a la producción de biomasa para utilización energética con fines no alimentarios como los biocombustibles de primera generación (Morales de la Rosa y col., 2014).

La biomasa lignocelulósica está constituida por tejidos de los vegetales cuya célula presenta una pared celular constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosa y sobre las que se deposita la lignina (Figura 1) (Rubin, 2008). Esta pared celular permite crear y sostener la estructura de las plantas para captar la radiación solar, confiriéndoles una mayor resistencia mecánica a posibles patógenos. Esta estructura compleja y resistente hace que resulte difícil su aprovechamiento para la obtención de compuestos derivados de la biomasa. Se requieren métodos de tratamiento y degradación para acceder a los compuestos más simples para ser fermentados. Ninguno de estos tratamientos es capaz de extraer completamente cada componente sin modificarlo o degradarlo en al menos una parte. Para un mejor entendimiento de lo que es la biomasa lignocelulósica y su aprovechamiento, es importante conocer cuáles son los componentes principales de las paredes celulares, los cuales se pueden dividir en tres: celulosa, hemicelulosa y lignina (Wyman, 1999; Rinaldi y col., 2009; Afanasjeva y col., 2017).



**Figura 1.** Estructura del material lignocelulósico en la que se señala a la celulosa de color verde, hemicelulosa de color amarillo y a la lignina en enlaces. Figura extraída de Ribeiro y col. (2016).

### 1.2.1. Celulosa

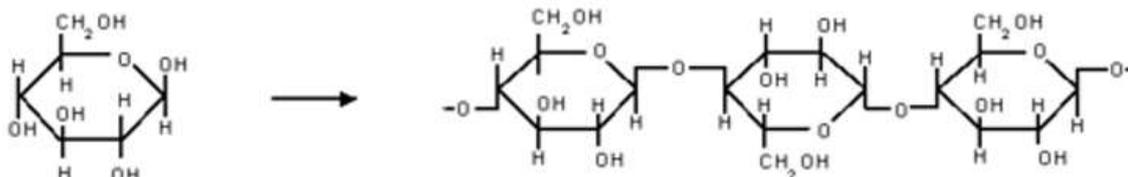
La celulosa fue identificada por primera vez por el químico francés Anselme Payen en 1838 que la aisló de varias plantas y determinó su fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , mediante análisis elemental. La celulosa es el polímero orgánico más abundante en el mundo, y se considera una fuente casi inagotable de materia prima para la demanda creciente de productos sostenibles con el medio ambiente (Klemm y col., 2005).

La celulosa es un polisacárido lineal de elevado peso molecular y alto grado de polimerización (GP), además de ser el componente principal en las paredes celulares de los vegetales. El grado de polimerización de la celulosa se define como el número  $r$  de unidades de glucosa anhidra ( $\beta$ -D-glucopiranosas) unidas entre sí mediante un enlace glicosídico entre el carbono 1 y 4 en la cadena polimérica (Rinaldi y col., 2009).

El enlace glicosídico (Figura 2) se forma por la reacción del grupo  $-OH$  hemiacetálico del carbono anomérico (carbono 1) de la  $\beta$ -D-glucopiranosas con el grupo  $-OH$  del carbono 4 de otra  $\beta$ -D-glucopiranosas. Por esta razón, las unidades de glucosa en los extremos de la cadena celulósica no son químicamente iguales. Uno de los extremos de la cadena de celulosa presenta un carbono anomérico que no está implicado en el enlace glicosídico, en este carbono 1 un grupo aldehído de carácter reductor y en el otro lado al final de la cadena el carbono anomérico está protegido por el enlace glicosídico, no mostrando propiedades reductoras (Casillas, 2010). La conformación piranosa, donde los carbonos y oxígenos son tetraédricos y la forma más estable es la de silla, presentan a los grupos  $-CH_2OH$ ,  $-OH$  y los enlaces glicosídicos en posición ecuatorial y los hidrógenos en posición axial. El que los grupos  $-OH$  se encuentren en posición ecuatorial, permite a la celulosa formar uniones por puentes de hidrógeno inter e intramoleculares dando lugar a las fibrillas elementales (Morales de la Rosa y col., 2015).

Las fibras elementales o micelas, están formadas entre 40 y 100 cadenas de celulosa donde se presentan zonas con una estructura cristalina que le confiere a la celulosa una gran resistencia y otras regiones amorfas que le otorgan elasticidad. La presencia de regiones amorfas en las fibras elementales permite mejor penetración de reactivos químicos, por tanto, mayor reactividad (Morales de la Rosa y col., 2015).

Las microfibras, a su vez, están formadas por las fibras elementales que forman uniones puentes de hidrógeno, y los hidrógenos en su superficie dan como resultado una estructura empaquetada altamente resistente e hidrofóbica. Se conocen siete polimorfos de celulosa ( $I_\alpha$ ,  $I_\beta$ , II, III, IIII, IVI, IVII), pero en la naturaleza solamente se encuentran las formas de celulosas  $I_\alpha$  y  $I_\beta$  (Rinaldi y col., 2009). En el material de origen vegetal lignocelulósico es predominante la forma  $I_\beta$ , (Nishiyama y col., 2012).

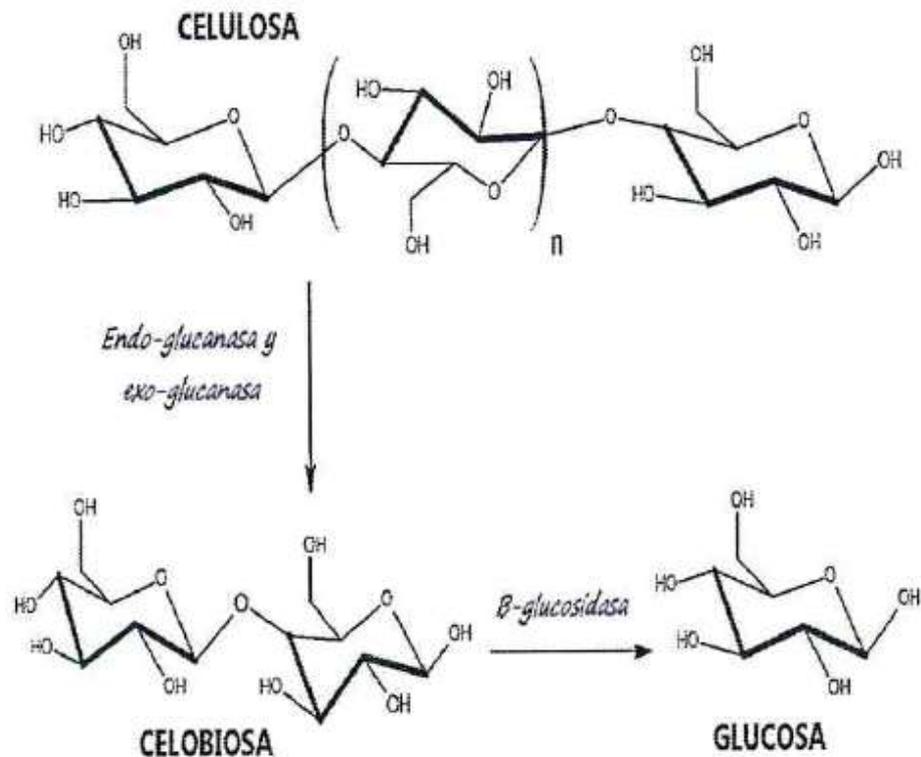


**Figura 2.** Estructura molecular de la celulosa.

#### 1.2.1.1. Enzimas que participan en la degradación de la celulosa

Para la degradación enzimática de la celulosa se hace necesaria la participación de un grupo de enzimas celulasas, que hidrolizan oligosacáridos y polisacáridos unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4 en monómeros de glucosa. Estas enzimas actúan de manera complementaria ya que sería imposible la degradación total de este compuesto con un solo tipo de enzima, por esta razón las celulasas se clasifican en endoglucanasas, exoglucanasas y glucosidasas (Lynd y col., 2002; Gutiérrez-Rojas y col., 2015).

Las endoglucanasas hidrolizan el enlace glucosídico  $\beta$ -1,4 que existe entre moléculas de glucosa en posiciones aleatorias en la zona interior de la estructura de las cadenas y su acción es más común en las zonas de celulosa amorfa. Como resultado de la acción de las endoglucanasas el polímero es dividido en fragmentos de menor tamaño, con lo que se generan nuevos extremos en la molécula. Las exoglucanasas actúan sobre los extremos de la celulosa liberando un dímero denominado celobiosa. Finalmente, las  $\beta$ -glucosidasas catalizan la reacción de hidrólisis del enlace glucosídico presente entre las dos moléculas de glucosa que forman celobiosa. A través de la acción conjunta de estos tres tipos de enzimas se obtiene la correcta degradación de celulosa hasta moléculas simples de glucosa (Zhang y Lynd, 2004).



**Figura 3.** Hidrólisis enzimática de la celulosa.

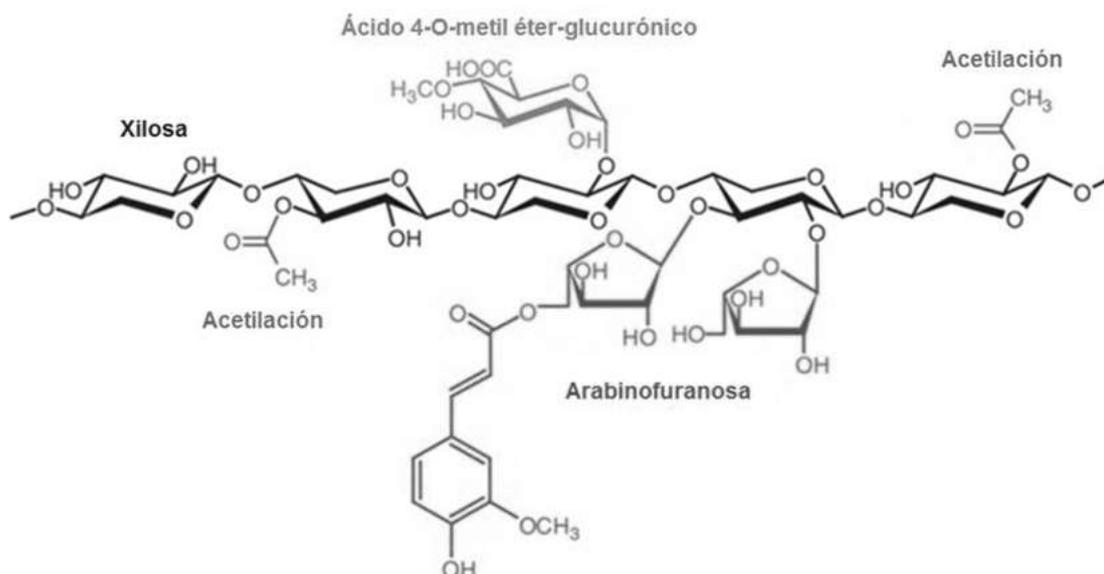
### 1.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa está compuesta por polímeros de diferentes azúcares con cadenas más cortas y ramificadas, lo que la hace más amorfa y más fácil de hidrolizar en sus azúcares constituyentes que la celulosa. Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa para proporcionar rigidez a la pared celular y son insolubles en agua. Los monosacáridos principales que encontramos en las hemicelulosas son cinco: glucosa, manosa y galactosa que son hexosas, y xilosa y arabinosa que son pentosas. Además de algunos ácidos urónicos (Morales de la Rosa y col., 2015). Los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre sí, todos en posición ecuatorial en el C1 y C4, y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) (Pérez y col., 2002) (Figura 4).

Además, forman parte de la estructura de la hemicelulosa, las sustancias pécticas (pectinas) que son polisacáridos heterogéneos y contienen un alto porcentaje de ácidos galacturónicos. Estos polisacáridos se encuentran en la pared celular, presentan estructuras y propiedades físico-químicas altamente variadas que, al igual que la celulosa, confieren resistencia a la estructura vegetal (Rinaldi y col., 2008; Morales de la Rosa y col., 2015).

#### 1.2.2.1. Enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa

La biodegradación de hemicelulosa requiere la acción sinérgica de xilanasas y de algunas otras enzimas auxiliares. Las xilanasas degradan la hemicelulosa para producir xilosa y/o arabinosa. Con respecto a las otras enzimas, las endo- $\beta$ -xilosidasas, rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, la glucuronosidasa remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico a partir de unidades de xilosa y las  $\beta$ -xilosidasas actúan sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-aril-xilopiranosídico produciendo xilosa (Sorek y col., 2014).



**Figura 4.** Estructura de la hemicelulosa

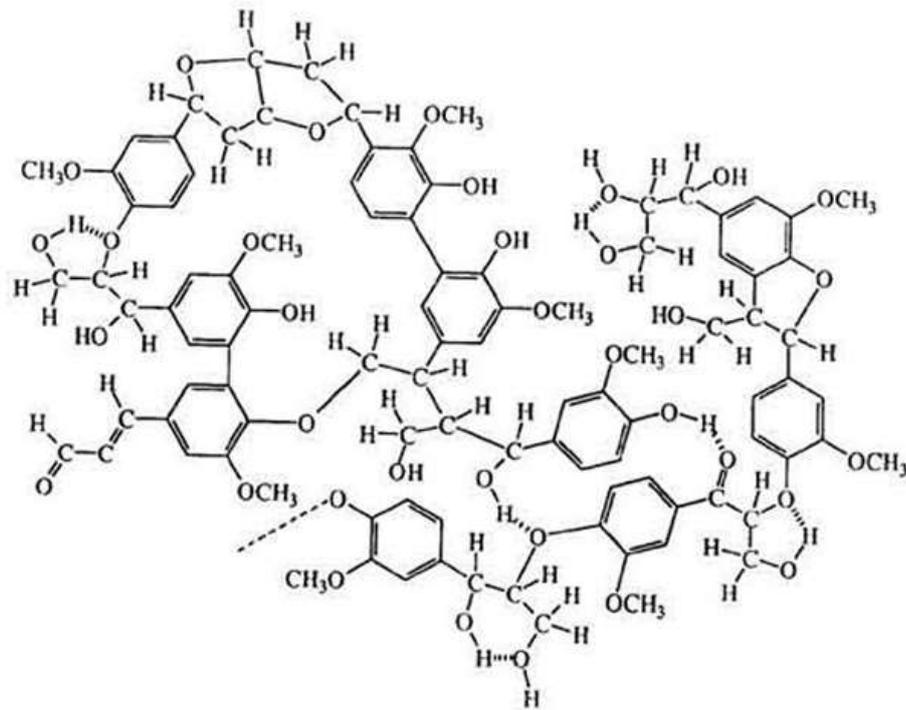
En la degradación de la hemicelulosa participan glicosil hidrolasas (xilanasas,  $\beta$ -xilosidasas,  $\alpha$ -D-galactosidasas,  $\alpha$ -D glucuronidasas, etc.) y esterasas (feruloil esterasas, acetil xilan esterasas, etc.). Las enzimas xilanasas catalizan la conversión del xilano de la hemicelulosa en xilosas, lo que deja expuesta la celulosa para ser degradada por celulasas (Bajpai, 2014).

### 1.2.3. Lignina

La lignina se encuentra en la biomasa entre un 10 y 30 % dependiendo de la especie vegetal. Detrás de celulosa y hemicelulosa, es el tercer biopolímero más abundante en la Tierra. Se encuentra principalmente en la lámina media de la pared celular y en las capas de la pared celular formando junto con la hemicelulosa una matriz alrededor de las microfibras de la celulosa (Figura 5) (Prinsen, 2010).

La lignina tiene una composición química muy compleja, pero de forma muy básica se pueden diferenciar tres tipos de unidades que se encuentran repetidas a lo largo de su estructura ramificada y amorfa. Estas unidades son: Unidad H (cumaril) que deriva del alcohol p-cumárico, la unidad G (guaiaxil) que deriva del alcohol coniferílico y la unidad S (siringil) que deriva del alcohol sinapílico. Se diferencian en la sustitución con un grupo metoxilo (-OMe) en las posiciones 3 y 5 de la unidad aromática (Rubin, 2008; Prinsen., 2010; Brandt y col., 2013).

Puesto que se trata de una estructura muy resistente, es necesario aplicar algún pretratamiento que aumente la susceptibilidad de este material a la degradación enzimática.



**Figura 5.** Estructura molecular de la lignina.

#### 1.2.4. **Compuestos minoritarios**

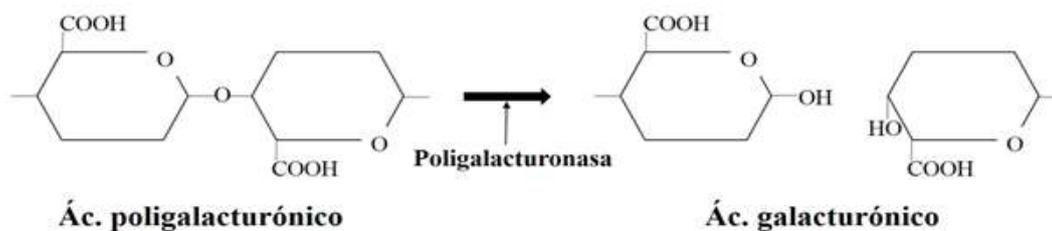
Los compuestos minoritarios representan la menor cantidad en peso total del material lignocelulósico. Incluyen a una amplia variedad de compuestos de bajo peso molecular y se pueden clasificar en extraíbles hidrofílicos, y extraíbles hidrofóbicos, y por otro lado, se encuentran las proteínas y cenizas (carbonatos, oxalatos, sílice y metales) (Fengel y Wegener, 1984).

#### 1.2.5. **Pectinas**

Los polisacáridos pécticos, como el homogalacturano y el ramnogalacturano, son los más complejos de la pared vegetal (de Vries y Visser, 2001). El homogalacturano está formado por una cadena principal de ácido D-galacturónico en uniones  $\alpha$ -1,4, que puede estar acetilado en las posiciones O-2 u O-3 o metilado en O-6. En otros tipos de pectinas, la cadena principal está unida a residuos de xilosa o apiofuranosa (Harholt y col., 2010). En el ramnogalacturano, las cadenas de ácido galacturónico están interrumpidas por residuos de ramnosa en uniones  $\alpha$ -1,2, que pueden estar ligados a cadenas laterales de arabinosa o galactosa, también ramificadas y sustituidas con residuos de ácido ferúlico, arabinosa y azúcares poco comunes, como L-fucosa (de Vries y Visser, 2001).

##### 1.2.5.1. **Enzimas que participan en la degradación de las pectinas**

Las enzimas que participan en la degradación de este polímero se conocen como pectinasas y se clasifican en tres grupos teniendo en cuenta el sitio de acción sobre el polisacárido: pectinesterasas, transforman la pectina metoxilada en pectina de bajo metoxilo o pectato y producen metanol a partir de los grupos carboxilos esterificados; poligalacturonasas (endo y exo), que hidrolizan el enlace glucosídico contiguo al grupo carboxilo libre; y las pectin y pectatoliasas, que rompen el enlace glucosídico por  $\beta$ -eliminación produciendo dobles ligaduras entre los carbonos 4 y 5 de la molécula de ácido D-galacturónico (figura 6).



**Figura 6.** Hidrólisis enzimática de polisacáridos pécticos (ácido poligalacturónico) por acción de enzimas pectinolíticas.

### 1.3. Biomásas lignocelulósicas que se utilizan para la producción de bioetanol 2G

La materia prima para la obtención de bioetanol 2G son los materiales lignocelulósicos, generalmente provenientes de residuos foresto y agroindustriales como paja, cáscara de cereales, aserrín, etc. Éstos son una alternativa muy interesante pues presentan grandes ventajas respecto a las materias primas convencionales (caña de azúcar, maíz y sorgo dulce), ya que no compiten con la industria alimentaria, además, muchas de ellas son residuos generados por la misma industria, y en otros casos, crecen en zonas consideradas marginales para la producción de alimentos, por lo tanto, su uso contribuiría al descenso del costo debido a la incorporación de subproductos de valor agregado. Otras ventajas son su amplia disponibilidad y bajo costo (Sims y col., 2010).

Una biomasa lignocelulósica generada a partir del descarte de industrias agroalimentarias es el orujo de uva. En el caso de la República Argentina, se ha estimado que sólo en la provincia de Mendoza, se producen anualmente 141.000 toneladas de este residuo (FAO, 2017).

#### 1.3.1. Orujo de uva

El orujo de uva es un residuo obtenido del proceso de elaboración de vino, siendo uno de los principales desechos de las bodegas, y su calidad varía de acuerdo al tipo de uva (tinta o blanca), la variedad y del procesamiento que haya sufrido. Está compuesto por piel, pulpa, tallos y semillas (Prozil y col., 2012; Mendes y col., 2013; Spigno y col., 2014). El escobajo está compuesto por 75 – 80 % de agua y el 20 - 25 % restante por celulosa, lignina, taninos y sustancias polifenólicas. El hollejo contiene taninos, materias ácidas y minerales. Las semillas tienen un tegumento muy lignificado y son ricas en lípidos. La pulpa es aprovechada para la obtención de mosto, es rica en azúcares, principalmente glucosa y fructosa (Guchu y col., 2015).

Argentina es el primer productor de vinos en Latinoamérica y el quinto mayor productor del mundo según la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV, 2021). Según registros del Instituto Nacional de Vitivinicultura, en el año 2021 en Argentina se destinaron a la vinificación aproximadamente 2,2 millones de toneladas de uva, de las cuales, en la provincia de Mendoza se vinificaron alrededor de 1,6 millones (INV, 2022).

Actualmente, la acumulación global de orujo de uva es de 4,8 millones de tn/año (promedio de los últimos 10 años) (FAO, 2017). En el caso de la República Argentina, de acuerdo a la producción anual de vinos y considerando que aproximadamente el 20 % del peso de la uva procesada constituye el orujo, se estima que por año en Argentina se producen aproximadamente 500.000 toneladas de este tipo de residuo. Por otro lado, la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) ha estimado que sólo en la provincia de

Mendoza se produce anualmente 141.000 toneladas de este residuo (FAO, 2017). Este hecho pone en relevancia el estudio del orujo de uva como materia prima para la producción de biocombustibles (Cáceres y col., 2012; Law y col., 2013; Toscano y col., 2013).

Es importante destacar que existen dos tipos de orujo que se generan en la industria vitivinícola. El orujo proveniente de uvas blancas, que se obtiene luego del prensado de la uva, retiene en su matriz entre el 30-40 % del jugo de uva con sus azúcares disponibles. El orujo proveniente de uva tinta, el cual se genera luego de la fermentación alcohólica, se considera un residuo agotado en azúcares. El orujo tinto producido en las bodegas es generalmente llevado a las destilerías en donde se realiza la extracción del alcohol remanente, el ácido tartárico y las semillas se aprovechan para la obtención de aceite. Luego de atravesar este proceso, el producto obtenido se denomina orujo agotado. Actualmente, después de dicha extracción, el orujo agotado se utiliza como enmienda orgánica en cultivos ya que actúa como mejorador del suelo; para la obtención de energía térmica a través de su combustión en calderas, o se desecha (Indiveri y col., 2013). Además, este tipo de orujo tinto también es utilizado como fuente para la extracción de compuestos fenólicos bioactivos (Fontana y col., 2013). Por otro lado, el orujo de uva blanca, no tiene un procedimiento claro para su disposición final y suele complicar a las bodegas para su eliminación, en general suele ser destinado a compostaje, sin otro aprovechamiento posterior de este tipo de residuo.

#### 1.3.1.1. Orujo de uva blanca

El orujo de uva blanca está compuesto principalmente por hollejo y semillas. Contiene una fracción de aproximadamente 40 % de azúcares simples solubles en agua, mayoritariamente formada por glucosa y fructosa, carbohidratos fermentescibles por *Saccharomyces cerevisiae*, y otra fracción de azúcares complejos o polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectina (Corbin y col., 2015).

En el proceso de vinificación de uvas blancas, el orujo se separa del mosto inmediatamente luego de ser prensado, por ello, los hidratos de carbono residuales que quedan en el orujo tras la molienda de las uvas son predominantemente monosacáridos solubles en agua, además de oligosacáridos y polisacáridos insolubles en agua de la pared celular. Los carbohidratos solubles pueden extraerse con un aporte energético mínimo y pueden ser directamente utilizados como sustrato crudo para la fermentación, mientras que los polisacáridos de la pared celular necesitan ser liberados a través de un pretratamiento y posterior sacarificación (Corbin y col., 2015).

Las diferencias en la composición de los orujos de uvas tintas y uvas blancas se muestran en la tabla 1. Los hidratos de carbono residuales que quedan en el orujo tras el prensado de las uvas son predominantemente monosacáridos solubles en agua, oligosacáridos y polisacáridos estructurales insolubles en agua constituyentes de la pared celular. Los carbohidratos solubles en agua, en orujo blanco, representan aproximadamente un tercio del peso seco un 37,6% p/p y 70% del contenido total de carbohidratos (Tabla 1). El orujo de uva tinta tiene un porcentaje mucho menor de carbohidratos solubles, 4,6% p/p. La cantidad comparativamente baja de carbohidratos solubles en agua detectados puede ser debido al procesamiento de las uvas durante la vinificación, ya que el orujo tinto permanece en contacto con el jugo durante varios días (maceración) para realzar el color y atributos sensoriales del vino. Durante este período, las uvas son sometidas a una extracción suave, pero prolongada, en la que se liberan ciertos compuestos y los carbohidratos son parcialmente fermentados (Corbin y col., 2015).

El orujo de uva también está enriquecido en pectinas solubles. Estudios previos han demostrado que el contenido de galacturonato en el mesocarpio de bayas de uva aumenta

del 26% al 46% de la pared celular y se vuelve más soluble a medida que avanza la maduración (Nunan y col., 1998). Las pectinas solubles se cuantificaron en extractos de orujo de uva, resultando en 4% y 9% p/p de la masa de Sauvignon Blanc y Cabernet Sauvignon, respectivamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición porcentual de orujos de uva tinta y blanca. (Fuente: Corbin y col., 2015)

	<b>Cabernet sauvignon (%p/p)</b>	<b>Sauvignon blanc (%p/p)</b>
<b>Componentes solubles</b>	<b>14,8</b>	<b>43,0</b>
<b>Carbohidratos solubles en agua</b>	<b>4,6 ± 1,5</b>	<b>37,6 ± 6,8</b>
Glucosa	2,1 ± 0,7	18,6 ± 3,7
Fructosa	2,5 ± 0,8	19,0 ± 3,2
<b>Otros extractivos (lignina, proteínas solubles, etc)</b>	<b>5,9</b>	<b>17,5</b>
<b>Componentes insolubles</b>	<b>63,9</b>	<b>30,6</b>
Monosacáridos	16,6 ± 0,3	10,9 ± 0,9
Xilosa	4,3 ± 0,9	2,4 ± 0,3
Ácido Galacturónico	1,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4
Manosa	1,6 ± 0,3	0,6 ± 0,1
Galactosa	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Arabinosa	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Lignina insoluble en ácido	32,5 ± 2,1	10,5 ± 2,3
Proteína	10,8 ± 0,3	7,2 ± 0,8
Grupos acetato	1 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Compuestos inorgánicos estructurales	3 ± 0,8	1,2 ± 0,2
<b>Balance de masa total</b>	<b>84,6</b>	<b>91,1</b>
<b>Total carbohidratos</b>	<b>31,4</b>	<b>53,9</b>

#### 1.4. Etapas para la conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol

La conversión de la biomasa lignocelulósica a bioetanol se realiza en varias fases: la primera de ellas comprende un pretratamiento de hidrólisis termoquímica necesario porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma una barrera contra el ataque enzimático. Un pretratamiento ideal permite reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial (Espinosa-Negrín y col., 2022). Existen, en general, diversos pretratamientos, los cuales se clasifican en función de la forma en que atacan al material lignocelulósico: mecánicos, térmicos, químicos, físico-químicos y biológicos (Sanchez Riaño, 2010).

La segunda fase comprende la hidrólisis enzimática, proceso catalizado por enzimas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa. El uso del pretratamiento como se explicaba anteriormente, facilita el desarrollo de esta etapa. Cabe destacar que en la mayoría de los procesos existe un primordial interés por los azúcares provenientes de la celulosa, sin embargo, la tendencia actual es el aprovechamiento integral de la biomasa, y en especial de otros azúcares como las pentosas, provenientes de la hemicelulosa, conllevando al uso de enzimas que actúen sobre dichas sustancias como es el caso de las xilanasas (Sanchez Riaño y col., 2010).

La tercera etapa es la conversión de los azúcares simples, obtenidos luego de la sacarificación enzimática tal como la glucosa y la fructosa a etanol. Esta etapa comprende la fermentación de dichos azúcares, y posterior destilación para la obtención del bioetanol. Este proceso biológico es llevado a cabo por la acción de levaduras que metabolizan los hidratos de carbono (en general azúcares: como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, etc.) para obtener productos finales como: etanol, dióxido de carbono y ganancia de energía (ATP) (Viñals-verde y col., 2012).

#### 1.4.1. Importancia de enzimas en la degradación de material lignocelulósico

La aplicación de enzimas ha cobrado importancia en la actualidad, ya que permite la biodegradación más rápida de celulosa presente en el material lignocelulósico.

En la etapa de hidrólisis enzimática se utilizan preparados celulíticos ó hemicelulíticos obtenidos a partir de microorganismos como hongos y bacterias, aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Principalmente son de utilidad aquellos que presentan producción extracelular de celulasas y/o hemicelulasas. La tabla 2 muestra los microorganismos más estudiados a partir de los cuáles se obtienen la mayor parte de los preparados enzimáticos comerciales.

**Tabla 2.** Microorganismos a partir de los cuáles se obtienen enzimas celulósicas y/o hemicelulósicas. (Fuente: Sanchez Riaño y col., 2010).

Tipo de M.O.	Características	Nombre del M.O.
<b>Bacterias</b>	Aeróbicas mesófilas y termófilas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Thermomonospora sp.</i>
	Anaeróbicas mesófilas y termófilas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i> .
<b>Hongos</b>	Aeróbicos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma koningii</i> .
	Aeróbicos Termófilos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i> .
	Anaerobios mesófilos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> .

De los microorganismos citados en tabla 2, los más comunes son los preparados celulíticos obtenidos a partir de *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Sanchez Riaño y col., 2010).

Por otra parte, la producción de enzimas celulasas además de ser utilizada para la conversión del material lignocelulósico, también tiene aplicabilidad en otras áreas industriales importantes como se detalla en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Aplicaciones de las enzimas en diferentes áreas industriales (Fuente: Singhanía y col, 2013).

Área Industrial	Aplicaciones de las Enzimas
Textil	Utilizadas para el ablandamiento del algodón
Alimentos	Clarificación de jugos de frutas
Balanceados	Mejora el valor alimenticio y el rendimiento de los animales
Detergentes	Suaviza y reduce mayormente las partículas de suciedad impregnada en la prenda
Biocombustibles	Producción enzimática de biodiesel con biomasa lignocelulósica. Obtención de biocombustible vía catálisis enzimática a partir de aceites de desecho provenientes de frituras en profundidad.

Debido a los altos costos que el uso de enzimas comerciales genera en los procesos industriales, sumado al interés de conseguir mejores y mayores rendimientos, tanto en la tasa de hidrólisis como de conversión de azúcares a etanol, se ha incrementado el uso de cultivos microbianos aislados de su ambiente natural, los cuales cultivados en el laboratorio son utilizados para la producción de enzimas de interés (Sánchez Riaño y col., 2010). En este sentido, las levaduras también podrían resultar una fuente promisoría para la producción de enzimas. Por ello se propone el uso de los cultivos microbianos (bacterias, levaduras) durante la segunda etapa de conversión de la biomasa celulósica en etanol.

### 1.5. Levaduras productoras de enzimas

*Saccharomyces cerevisiae*, la principal levadura vínica, no es reconocida por ser una buena productora de enzimas, mientras que las levaduras vínicas no-*Saccharomyces* (incluyendo los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*) han sido descritas como fuentes potenciales de producción de enzimas tales como proteasas, esterases, pectinasas, lipasas y glicosidasas para uso industrial (Charoenchai y col., 1997; Rosi y col., 1994., Wang y col., 2016).

Con respecto a la actividad celulasa, muy pocas levaduras han demostrado habilidad para degradar la celulosa. Jimenez y col., (1991) aislaron cepas de levaduras pertenecientes, a especies de *Candida*, *Pichia* y *Trichosporon*, y descubrieron que las celulasas producidas por estas levaduras podían hidrolizar sustratos lignocelulósicos a altas temperaturas y en un amplio rango de pH, indicando que pueden utilizarse para producir azúcares fermentables y bioetanol.

En cuanto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, existe controversia puesto que algunos autores han encontrado que cepas de *Saccharomyces* producen enzimas intracelulares en ciertas condiciones de ensayo, y otros defienden la idea de que la síntesis de la enzima es nula en este género de levaduras. Como defensores de su capacidad enzimática, Dubourdie y col. (1988), observaron que las oxidasas localizadas en el espacio periplásmico de *Saccharomyces* tenían la capacidad de hidrolizar los monoterpenos glicosilados de las uvas Moscatel, encontrando que esta actividad era glucosa independiente. Más tarde, Rosi y col. (1994) realizaron un estudio con 370 levaduras de origen vínico, de las cuales 153 eran *Saccharomyces*, y de éstas, sólo una cepa presentó actividad  $\beta$ -glucosidasa. El estudio observó que la síntesis de la enzima se inducía cuando el microorganismo crecía en aerobiosis y se inhibía ante la presencia de glucosa o etanol.

En otros estudios sobre la producción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa por levaduras no-*Saccharomyces*, los autores detectaron la actividad en el sobrenadante de los cultivos (Rosi y col., 1994), en la célula entera (McMahon y col., 1999, Manzanares y col., 1999, Mendes-Ferreira y col., 2001) y otros la asociaron a la producción intracelular (Rosi y col., 1994, McMahon y col., 1999, Strauss y col., 2001).

En cuanto a la producción de xilanasas, numerosas especies de bacterias y hongos han reportado esta actividad enzimática, mientras que la actividad xilanolítica no ha sido muy frecuentemente expresada en levaduras. Algunos estudios sugieren la degradación de xilanos por cepas de *Pichia sp* (Özcan y col., 1991), *Cryptococcus sp.* (Gomes y col., 2015) y *Candida sp.* (Shariq y col., 2019). Gomes y col. (2015) además sugieren que dicha actividad enzimática puede verse incrementada por la utilización de muestras seleccionadas y enriquecidas, ya que lograron aislar una cepa psicotrófica de *Cryptococcus adeliae* de la Antártida optimizando las condiciones de ensayo empleando un medio de cultivo que contenía xilano y extracto de levadura en relación 2:1 con pH 7.5.

Escribano y col. (2017) realizaron un *screening* de actividades enzimáticas de levaduras no-*Saccharomyces*, entre las cuales evaluaron especies de *Candida sp*, *Cryptococcus sp*, *Debaryomyces hansenii*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Lachancea thermotolerans*, y observaron que ésta última fue la única levadura que evidenció actividad xilanasas. Por otro lado, Strauss y col. (2001) evaluaron cepas de *Pichia sp.*, *Candida sp.*, *Kloeckera sp.* y *Debaryomyces sp.*, evidenciando actividad xilanasas en los aislados *C. stellata*, *C. pucherrima* y *C. oleophila* en placas de YPGE (extracto de levadura, peptona, agar, glicerol, agua destilada y etanol); y de *K. apiculata* y *C. stellata* en medios líquidos.

Por último, las enzimas pécticas de uso industrial siempre fueron producidas por hongos y bacterias. Las levaduras son una fuente alternativa para la producción a gran escala de pectinasas comerciales (Blanco y col., 1994; Jia y Wheals, 2000). La capacidad de secretar pectinasas por levaduras *Saccharomyces sp.* y no-*Saccharomyces* ha sido estudiada por varios autores (Strauss y col., 2001; Fernández-González, y col., 2004) en muchos casos con resultados favorables principalmente para especies de levaduras no-*Saccharomyces*.

El presente trabajo se enmarca en el Proyecto de Investigación PIP CONICET e INTA para el Aprovechamiento energético de orujos de uva para la producción de bioetanol 2G, el cual aborda la selección de levaduras con potencial para la producción de enzimas, utilización de azúcares C6 y C5 y elevado potencial fermentativo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Contribuir a la selección de levaduras con capacidad para producir enzimas de interés biotecnológico.

### **2.2. Objetivos específicos**

Evaluar la producción de enzimas de levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas en medios de cultivo específicos.

Seleccionar aquellas levaduras que presenten los mejores perfiles de actividad enzimática.

### 3. HIPÓTESIS

Los diferentes aislados de levaduras presentan actividades enzimáticas con potencial uso biotecnológico.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Microorganismos evaluados

Se evaluaron en total 30 levaduras diferentes, 16 de ellas aisladas de orujos de uva locales y otras 14 pertenecientes a la Colección de Microorganismos de INTA Mendoza (CoMIM) (Tabla 4). Algunas levaduras han sido previamente identificadas mientras que otras no. Esta identificación se realizará de acuerdo a los resultados que se obtengan y si resultan interesantes para alcanzar el objetivo propuesto.

**Tabla 4.** Cepas de levaduras empleadas en el *screening* de actividades enzimáticas.

	Nomenclatura	Especie	Origen aislamiento	del Lugar	
Identificadas	INS 15	<i>S. cerevisiae</i>	Suelo	Luján de Cuyo	
	INS 18	<i>S. cerevisiae</i>	Suelo	Luján de Cuyo	
	INBK 28	<i>S. cerevisiae</i>	Corteza	Luján de Cuyo	
	Mb40NA1	<i>S. cerevisiae</i>	Malbec	Luján de Cuyo	
	Mb40NC2	<i>S. cerevisiae</i>	Malbec	Luján de Cuyo	
	MC9	<i>Z. rouxii</i>	Mosto Concentrado	Rivadavia	
	SJ1	<i>C. vinaria</i>	ND	San Juan	
	SJ2	<i>C. sake</i>	ND	San Juan	
	SJ3	<i>D. vanrijiae</i>	ND	San Juan	
	E3	<i>D. bruxellensis</i>	Malbec	La Consulta	
	CH30	<i>D. bruxellensis</i>	Merlot	Luján de Cuyo	
	BMB1	<i>W. anomalus</i>	ND	San Juan	
	No identificadas	TT1	NI	Torrontés	Luján de Cuyo
		CRI 2	NI	Criolla	Luján de Cuyo
CRI 4		NI	Criolla	Luján de Cuyo	
MALR 1		NI	Malbec	Luján de Cuyo	
CSI 1		NI	Cabernet sauvignon	Luján de Cuyo	
CSI 4		NI	Cabernet sauvignon	Luján de Cuyo	
GRE 12		NI	Grenache	Luján de Cuyo	
GRE 23		NI	Grenache	Luján de Cuyo	
GRE 27		NI	Grenache	Luján de Cuyo	
MAI 4		NI	Moscatel amarillo	Luján de Cuyo	
CPPN 32		NI	Pinot noir	Agrelo	
CPPN 33		NI	Pinot noir	Agrelo	
CPCH 31		NI	Chardonay	Agrelo	
CPCH 32		NI	Chardonnay	Agrelo	
CPCH 41		NI	Chardonnay	Agrelo	
CPCH 42		NI	Chardonnay	Agrelo	
INenB2.2	NI	ND	Luján de Cuyo		
INenB2.5	NI	ND	Luján de Cuyo		

NI: no identificado. ND: no detectado.

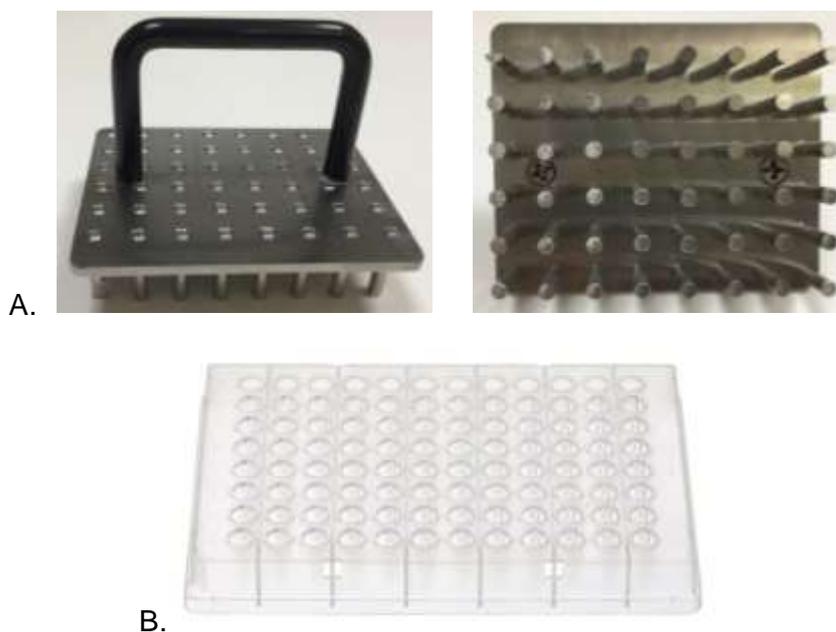
#### 4.2. Crecimiento de levaduras y preparación de inóculos

Las levaduras se activaron en medio sólido YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L, agar 20 g/L, agua destilada 1000 mL) mediante siembra por estrías e incubación en estufa a 28 °C durante 24 - 48 horas. Una vez crecidas, se inocularon en medio de agotamiento líquido (Yeast Nitrogen Base 6,7 g/L (Sigma-Aldrich Inc.), glucosa 1 g/L, agua destilada 1000 mL) para que las levaduras utilizaran las sustancias de reserva que poseen y evitar posibles falsos positivos (Kurtzman y Fell, 1998). Los tubos inoculados se incubaron en estufa a 28 °C durante 48 horas.

Se midió la densidad óptica (DO) de las suspensiones de levaduras en espectrofotómetro a una longitud de onda  $\lambda = 600 \text{ nm}$  para luego ajustarlas a una  $DO = 0,3$  (equivalente a una concentración de  $10 \text{ E}6 \text{ células/mL}$ ). Se empleó como blanco el medio líquido de agotamiento sin inocular.

#### 4.3. Detección de actividades enzimáticas de interés

La capacidad de las levaduras para producir enzimas de interés biotecnológico se realizó mediante la siembra de las suspensiones ( $DO=0,3$ ) por *replica plate* en placas de Petri con los medios de cultivo adecuados para evaluar la expresión de cada enzima en particular. Para la técnica de la *replica plate* se utilizó un peine de acero inoxidable, previamente esterilizado, y una placa multipocillo donde se colocaron las suspensiones de cada una de las levaduras evaluadas (Figura 7). Todas las actividades enzimáticas se evaluaron por triplicado en medio sólido (20 g/L agar-agar) con  $\text{pH } 5 \pm 0,5$ . Las placas se incubaron 5 - 7 días a 28°C.



**Figura 7.** A) Peine para *replica plate*. B) Placa multipocillo.

Todos los medios de cultivo se prepararon mediante disolución de sus componentes en agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

#### 4.3.1. Actividad celulasa

La actividad celulasa se determinó en placas con medio YPD adicionado con 4 g/L carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma-Aldrich Inc.) y placas con YPGE (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, agar 20 g/L, glicerol 30 g/L, agua destilada 950 mL, etanol 20 mL adicionado después de autoclavar) con el agregado de 4 g/L CMC (Strauss y col., 2001).

Para revelar la actividad enzimática de las levaduras, se lavaron las colonias con agua destilada hasta desprenderlas del medio de cultivo y luego se tiñó el medio con solución indicadora Rojo Congo (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos en agitación. Luego se descartó el excedente de colorante y se destiñeron las placas con solución 1M NaCl durante 5 minutos en agitación.

*Resultado positivo:* la actividad celulasa se evidenció mediante la presencia de un halo de clarificación en torno a la colonia. Esta actividad se expresó con un rango de signos positivos de “+, ++, +++ y ++++” definidos de acuerdo al aumento del diámetro del halo, y signo “-” cuando no se observó halo.

#### 4.3.2. Actividad $\beta$ -glucosidasa

Strauss y col. (2001) sugirieron que los análogos de  $\beta$ -glucósidos más confiables, eran los derivados de arbutina o esculina. Estos compuestos se incluyen en medios sólidos y si las cepas presentan actividad  $\beta$ -glucosidasa, la  $\beta$  glucósido arbutina se divide en glucosa e hidroquinona, esta última reacciona con los iones férricos presentes en el medio, dando como resultado un precipitado de color marrón.

La detección de la actividad  $\beta$ -glucosidasa se realizó en placas de medio YNB con arbutina como sustrato (Yeast Nitrogen Base 6,7 g/L, Sigma-Aldrich Inc.; arbutina 5 g/L, agar 20 g/L, agua destilada 950 mL), ajustado a pH 5,0  $\pm$  0,5 con solución tampón citrato (ácido cítrico 0,1M 20,5 mL, citrato sódico 0,1M 29 mL, agua destilada 100 mL) adicionado con 20 mL/L de una solución estéril de citrato férrico de amonio al 1% (citrato férrico de amonio 1 g, agua destilada 100 mL) (Rosi y col., 1994).

*Resultado positivo:* la actividad  $\beta$ -glucosidasa se evidenció con la hidrólisis del medio y la aparición de un halo de color marrón en torno a la colonia debido a la precipitación del hierro (Rosi y col., 1994). Esta actividad se expresó con un rango de signos positivos de “+, ++, +++ y ++++” conforme aumentó la intensidad del color marrón de la colonia y signo “-” cuando no se observó crecimiento o color marrón en la misma.

#### 4.3.3. Actividad celobiasa

Se determinó la actividad celobiasa de las levaduras mediante su siembra en medio Yeast Nitrogen Base (Sigma-Aldrich Inc.) conteniendo 20 g/L celobiosa como única fuente de carbono (YNB 6,7 g/L; celobiosa 20 g/L, agar 20 g/L, agua destilada 950 mL).

*Resultado positivo:* la actividad celobiasa se evidenció con el crecimiento de las levaduras en el medio (Strauss y col., 2001). Esta actividad se expresó con signo “+” o “-” de acuerdo al desarrollo o no de colonias.

#### 4.3.4. Actividad xilanasa

La actividad xilanasa se realizó mediante la siembra de las levaduras en el medio YPGE con Remazol Brilliant Blue Xylan 2 g/L (RBB-Xylan, Sigma-Aldrich Inc.) (extracto de

levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, agar 20 g/L, glicerol 30 g/L, agua destilada 950 mL, etanol 20 mL adicionado después de autoclavar).

*Resultado positivo:* La actividad xilanasa se evidenció mediante la presencia de un halo de clarificación en torno a la colonia (Strauss y col., 2001). Esta actividad se expresó con signos “+, ++, +++ y ++++” conforme aumentó el diámetro del halo alrededor de la colonia, y con signo “-“cuando no se observó halo.

#### 4.3.5. Actividad pectinasa

Se determinó la actividad pectinasa de las levaduras mediante su siembra en medio agar poligalacturonato (ácido poligalacturónico 12,5 g/L, fosfato de potasio (pH 3.5) 6,8 g/L, Yeast Nitrogen Base 6,7 g/L (Sigma-Aldrich Inc.), glucosa 10 g/L, agar 20 g/L, agua destilada 1000 mL) (McKay, 1990).

Para revelar la actividad enzimática de las levaduras, se lavaron las colonias con agua destilada arrastrándolas en su totalidad. Luego se tiñeron con Rojo Ruteno 0,1%, dejando las placas en agitación por 10 minutos. Se descartó el excedente de colorante y se dejaron secar tapa arriba.

*Resultado positivo:* la actividad pectinasa se evidenció por la aparición de un halo púrpura alrededor de la colonia. Esta actividad se expresó con signos “+, ++, +++ y ++++” conforme aumentó el diámetro del halo alrededor de la colonia, y con signo “-“cuando no se detectó halo en la colonia.

#### 4.3.6. Control negativo

Se realizó con medio de agotamiento sin inocular.

#### 4.3.7. Control positivo

Como control, se utilizaron todas las cepas de levaduras crecidas en placas de YPD con glucosa como fuente de carbono.

No se realizaron controles positivos de cada actividad enzimática.

Para cada actividad enzimática se utilizaron 3 placas con los medios de cultivo adecuados, dos se utilizaron para la siembra de 28 cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, y la tercera placa, para la siembra de levaduras de crecimiento lento como *Dekkera bruxellensis* y *Wickehamomyces anomalus* ya que requerían un mayor tiempo de incubación.

### 4.4. Evaluación de resultados y selección de levaduras

Se realizó un análisis cualitativo de los datos obtenidos lo que permitió seleccionar aquellas levaduras con mayor potencial para la producción enzimática, las cuales seguirán siendo caracterizadas con respecto a otros parámetros de importancia para ser utilizadas en la degradación y fermentación de material lignocelulósico.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 5 se muestran todos los perfiles enzimáticos para todas las levaduras evaluadas. En la misma puede observarse que las cepas identificadas como *S. cerevisiae* sólo expresaron actividad celobiasa (16,7%) en las condiciones del ensayo. En tanto que las

cepas de especies no identificadas, las cuales, por su morfología celular y de las colonias, y por el sustrato de su aislamiento (orujo de uva sin fermentar), se presuponen dentro del grupo no-*Saccharomyces*, presentaron diversas actividades enzimáticas y en algunos de los casos más de una actividad enzimática para cada aislado. El mayor porcentaje de levaduras presentó actividad celobiasa (76,7 %), el 40 % de las levaduras presentaron actividad  $\beta$ -glucosidasa, el 6,7 % mostraron actividad celulasa, y sólo el 3,3 % expresó la actividad de la enzima pectinasa. Para ninguno de los dos grupos, la actividad de la enzima xilanasa fue positiva (0 %).

De los 30 aislamientos, 28 cepas expresaron al menos una actividad enzimática. Como se mencionó anteriormente, todas las cepas identificadas como *S. cerevisiae* presentaron actividad celobiasa. Esta actividad enzimática fue expresada por la mayoría de las cepas evaluadas, tanto en las que aún no han sido identificadas (presumiblemente no-*Saccharomyces*) como en las cepas pertenecientes a las especies *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida binaria*, *Candida sake*, *Debariomyces variijae*, *D. bruxellensis* y *W. anomalus*. Solo dos aislados no presentaron actividad celobiasa (Tabla 5).

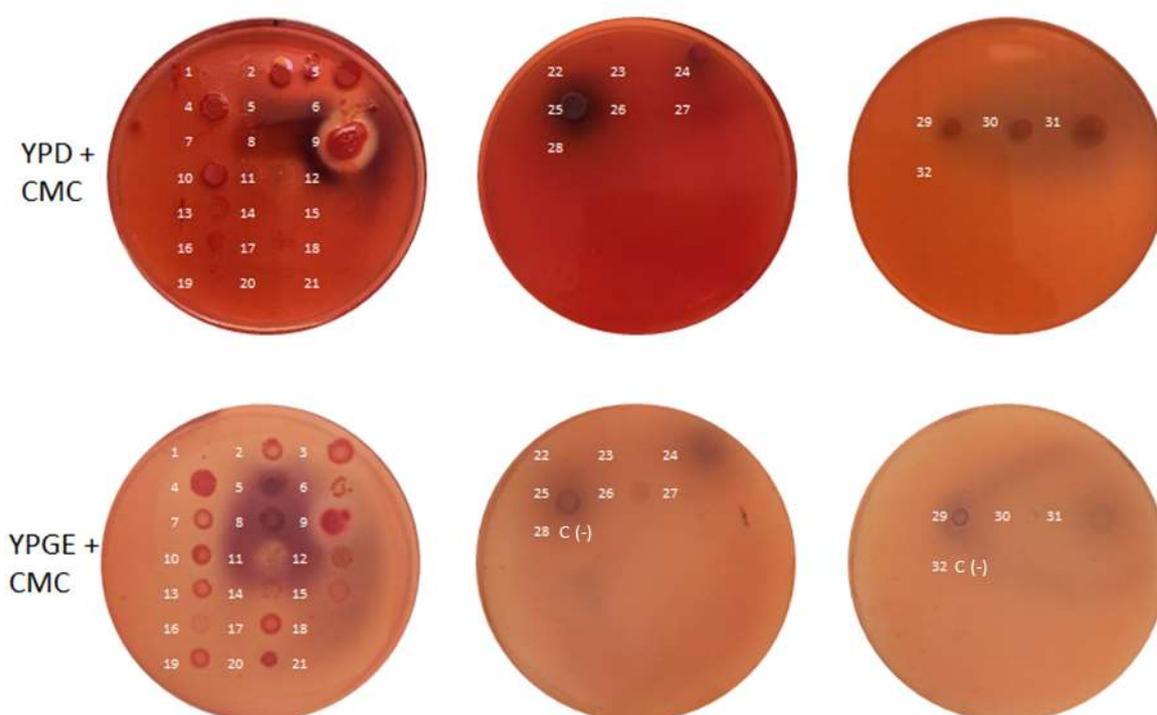
**Tabla 5.** Perfiles de actividades enzimáticas de aislamientos de levaduras enológicas.

Cepas	Nº	ID	Actividad enzimática					
			C (+)	AC	A $\beta$ -G	ACB	AX	AP
No <i>Saccharomyces</i>	1	TTI 1	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	2	CRI 2	+	-	+++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	3	CRI 4	+	-	+++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	4	MALR 1	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	5	CSI 1	+	-	++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	6	CSI 4	+	-	+++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	7	GRE 23	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	8	GRE 27	+	-	++++	+	-	+
No <i>Saccharomyces</i>	9	MAI 4	+	++++	++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	10	CPPN 32	+	-	+++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	11	CPPN 33	+	+++	++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	12	GRE 12	+	-	++	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	13	CPCH 41	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	14	CPCH 42	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	15	CPCH 31	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	16	CPCH 32	+	-	-	+	-	-
<i>Saccharomyces</i>	17	<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Saccharomyces</i>	18	<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Saccharomyces</i>	19	<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	20	<i>Z.rouxii</i>	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	21	<i>C.vinaria</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Saccharomyces</i>	22	<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	+	-	-
<i>Saccharomyces</i>	23	<i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	24	<i>C.sake</i>	+	-	+	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	25	<i>D.vanriijae</i>	+	-	+	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	26	INenB2.2	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	27	INenB2.5	+	-	-	-	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	29	<i>D.bruxellensis</i>	+	-	-	+	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	30	<i>D.bruxellensis</i>	+	-	-	-	-	-
No <i>Saccharomyces</i>	31	<i>W.anomalus</i>	+	-	+	+	-	-
	28							
	32	C (-)	-	-	-	-	-	-
Nº total de aislamientos			30					
Aislamientos positivos			30	2	12	28	0	1
% Aislamientos positivos			100,0%	6,7%	40,0%	93,3%	0,0%	3,3%
% Aislamientos <i>Saccharomyces</i>			16,7%	0,0%	0,0%	16,7%	0,0%	0,0%
% Aislamientos No <i>Saccharomyces</i>			83,3%	6,7%	40,0%	76,7%	0,0%	3,3%

C(+) Control positivo. AC: Actividad Celulasa en medio sin etanol, A  $\beta$ G: Actividad  $\beta$ -glucosidasa, ACB: Actividad Celobiasa, AX: Actividad Xilanasas, AP: Actividad Pectinasas.

Los resultados del estudio de la actividad celulasa, mostraron que las levaduras *Saccharomyces* estudiadas no presentaron expresión de esta enzima, y sólo dos de las cepas (presuntivamente no-*Saccharomyces*) expresaron dicha actividad (Tabla 5). Esta se evidenció por la formación de un halo de clarificación alrededor de las colonias en ambos medios de cultivo, en los aislamientos 9 y 11 que aún no han sido identificados (Figura 8).

Estos resultados podrían llegar a ser coincidentes con los obtenidos en un estudio realizado por Strauss y col.(2001) que evidenciaron esta actividad enzimática en cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* y *Candida pulcherrima*. En ésta última especie notaron que la actividad era expresada cuando se emplearon placas con medio YPD y no en placas de YPGE, sugiriendo que la expresión de esta enzima podría ser inhibida por el etanol



**Figura 8.** Actividad celulasa en medio YPD e YPGE adicionados con CMC

En el resto de las levaduras evaluadas, si bien se observó desarrollo de las colonias en los medios de cultivo, no se observó actividad de esta enzima por ausencia de halo de clarificación (Figura 8). Nuestros resultados también resultan coincidentes con los obtenidos en un estudio cualitativo de actividades enzimáticas en levaduras vínicas, realizado por Maturano y col. (2009) que observaron que, de 161 aislados, 45 correspondientes a levaduras no-*Saccharomyces*, 111 *Saccharomyces* sp. y 5 cepas de referencia; sólo un bajo número de aislados (8), presentaron actividad celulasa a pH 6,5, todos correspondientes a levaduras del género *Candida*.

En cuanto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, podemos decir que es una de las enzimas con mayor relevancia en ciertos procesos, como el enológico ya que está implicada en la liberación de monoterpenos mediante hidrólisis de los precursores glicosilados (Cordero Otero y col., 2003; Belda y col., 2016; Padilla y col., 2016; Escribano y col., 2017). Dentro de nuestro objetivo de contribuir a la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica en el proceso de obtención de bioetanol, resulta importante evaluar esta actividad enzimática ya que, la  $\beta$ -

glucosidasa cataliza la reacción de hidrólisis del enlace glucosídico presente entre moléculas de glucosa, dejándolas disponibles para la fermentación.

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a esta actividad enzimática, mostraron que los aislados pertenecientes al género *Saccharomyces* no presentaron actividad  $\beta$ -glucosidasa. Por otro lado, las levaduras identificadas y no identificadas agrupadas bajo la categoría de no- *Saccharomyces* expresaron la actividad en diferente porcentaje y con diferente intensidad. Once levaduras de las 25 pertenecientes a este grupo arrojaron resultados positivos para esta actividad enzimática (Tabla 5).

Cómo se puede observar en la Figura 9, todas las cepas estudiadas crecieron en el medio de cultivo empleado, a excepción de una cepa no-*Saccharomyces* (27) y dos cepas de *D. bruxellensis* (29 y 30) en las que no se observó desarrollo de colonias. De los aislados no identificados del grupo no-*Saccharomyces*, la cepa 8 presentó una coloración marrón oscura lo que puede interpretarse como una mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa; las cepas 2, 3, 6 y 10 presentaron una coloración marrón rojiza menos intensa y en las cepas 5, 9, 11 y 12 la intensidad de la coloración fue menor, luego del agregado de una solución estéril de citrato férrico de amonio (Figura 9). Por otro lado, las cepas de *C. sake* (24), *D. varrijiae* (25) y *W. anomalus* (31) presentaron un color beige claro lo que representaría una menor expresión de la enzima (Figura 9).



**Figura 9.** Actividad  $\beta$ -glucosidasa en medio YNB con arbutina.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran cierta concordancia con los resultados obtenidos por Rosi y colaboradores (1994), quienes realizaron una investigación con 317 levaduras de origen vinico, de las cuales 153 eran *Saccharomyces*, y de éstas, sólo 1 presentó actividad  $\beta$ -glucosidasa en un medio con arbutina como fuente de carbono, observándose una importante actividad  $\beta$ -glucosidasa en diferentes especies no-*Saccharomyces* como *Debaryomyces*, *Kloeckera apiculata* y *Hansenula anómala*. Estos resultados que evidencian la escasa presencia de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en cepas *Saccharomyces* pero una importante actividad en algunas cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, están en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la actividad es nula para los aislados de *Saccharomyces cerevisiae*, pero se observan diferentes intensidades de la actividad enzimática para ciertas levaduras pertenecientes al grupo no-*Saccharomyces*.

La mayor incidencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa observada dentro de las levaduras no-*Saccharomyces* en nuestro ensayo, también coinciden con Mendes-Ferreira y colaboradores (2001) que evaluaron la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en 160 levaduras mediante la prueba de su capacidad para hidrolizar arbutina en placas de agar. Estos autores observaron que solo las especies no- *Saccharomyces* exhibieron actividad  $\beta$ -glucosidasa, identificando a las especies *K. apiculata*, *W. anomalus* y *Metschnikowia*

*pulcherrima* como potenciales candidatos para su uso en la liberación de terpenos por mostrar una intensa actividad  $\beta$ -glucosidasa.

Por otro lado, cabe destacar los trabajos realizados por Cordero-Otero y col. (2003) y Belancic y col. (2003) en los cuales pudieron identificar actividad  $\beta$ -glucosidasa en *D. hansenii*, lo cual es coincidente con nuestros resultados para el aislado correspondiente a esta especie.

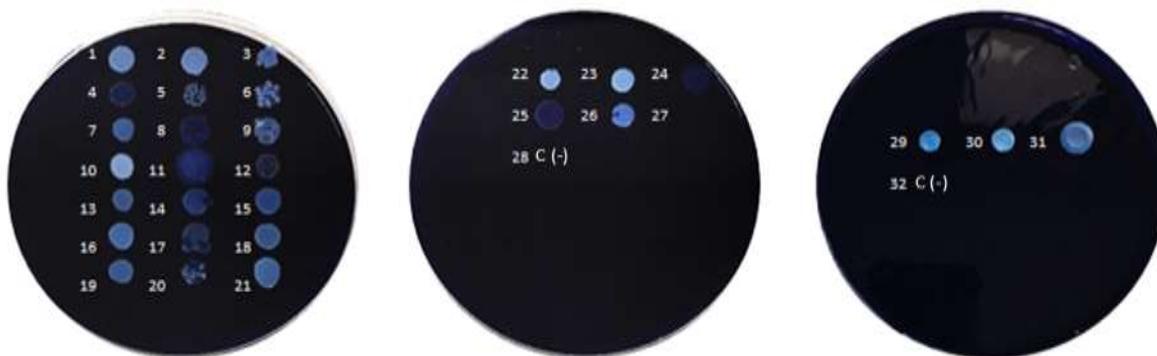
Para la actividad celobiasa, de las 30 cepas evaluadas en el presente estudio, 28 fueron capaces de crecer en medio YNB adicionado con celobiosa como única fuente de carbono, entre ellas, 5 cepas pertenecientes al género *Saccharomyces* y 23 aislados pertenecientes al grupo identificado y no identificado de no- *Saccharomyces* (Tabla 5). Como se observa en la Figura 10, la presencia de actividad celobiasa se puso en evidencia por el desarrollo de colonias en el medio YNB adicionado con celobiosa. Una de las cepas sin identificar pertenecientes al grupo de levaduras no-*Saccharomyces* no creció en el medio empleado (27) y tampoco lo hizo la cepa identificada como *D. bruxellensis* (30).



**Figura 10.** Actividad celobiasa en medio YNB con celobiosa.

Cordero Otero y col. (2003) llevaron a cabo una investigación sobre la caracterización de la actividad celobiasa producida por 20 cepas de levaduras enológicas no *Saccharomyces* (*Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Picchia*), empleando celobiosa como fuente de carbono. Cuantificaron la actividad enzimática desarrollada por cada cepa y evaluaron el efecto de la concentración de glucosa y etanol (entre otros parámetros) sobre la misma. Concluyeron que, todas las cepas evaluadas tenían la capacidad de producir celobiasa en mayor o menor intensidad, y que además, las cepas de *Debaryomyces* presentaron mayor resistencia a compuestos inhibitorios de la actividad enzimática (glucosa y etanol). Asimismo, Vasserot y col. (1989) argumentan que la enzima celobiasa es constitutiva, aunque observaron que la actividad era más intensa cuando se añadía al medio un compuesto que contenía un enlace glucósido. De acuerdo a lo citado, nuestros resultados demuestran que la actividad celobiasa es expresada de manera constitutiva por las levaduras evaluadas en un medio con celobiosa como única fuente de carbono.

En cuanto a la actividad xilanasa, según se observa en la Figura 11, todas las cepas fueron capaces de crecer en el medio de cultivo YPGE adicionado de RBB-Xylan (color azul), pero ninguna de las 30 cepas estudiadas evidenció halo de clarificación alrededor de la colonia, por lo tanto, la actividad de esta enzima fue nula para todas las cepas estudiadas.



**Figura 11.** Actividad xilanasa en medio YPGE adicionado de RBB-Xylan.

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Maturano y col. (2009) quienes evaluaron la capacidad de expresar la enzima xilanasa en 45 aislamientos de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, empleando un medio de cultivo compuesto por YNB sin aminoácidos, asparagina,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , agar 4- O-metil glucuronoxilano de madera de abedul, ajustado a pH 4 y 6,5. En este medio de cultivo a pH 6,5, 13 de estos aislados correspondientes a levaduras no-*Saccharomyces* como *Candida*, *Pichia*, *Dekkera*, *Hanseniaspora* y *Debaromyces*, presentaron actividad xilanasa, pero no se observó esta actividad a pH 4. En el mismo estudio, las cepas *Saccharomyces* no evidenciaron esta actividad enzimática, en ningún pH evaluado. Se podría pensar que el pH es un factor clave para la expresión de la enzima. En nuestro trabajo, aunque las levaduras fueron capaces de crecer en el medio de cultivo empleado, ninguna evidenció actividad xilanasa a pH 6,5.

Con respecto a la actividad de la enzima pectinasa en medio agar poligalacturonato, se observó que ni las cepas pertenecientes al género *Saccharomyces* ni la mayoría de las pertenecientes al grupo no-*Saccharomyces* y las no identificadas aún, expresaron dicha actividad enzimática (Tabla 5). Solo se observó la aparición de un halo color púrpura alrededor de la colonia de la cepa 8 (Figura 12) correspondiente a una levadura presuntamente no-*Saccharomyces* aún no identificada. En otras 4 cepas (6, 7, 13 y 19), se pudo observar la presencia de un halo color amarillento, pero no estaría evidenciando la actividad de dicha enzima o el resultado podría ser dudoso (Figura 12). Las placas con las cepas 22 a la 31 no pudieron ser fotografiadas porque se demoró el registro, aunque se observó previamente que ninguna de las levaduras mencionadas, presentó actividad pectinasa.



**Figura 12.** Actividad pectinasa en medio Agar poligalacturonato.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Maturano y col. (2009) que, si detectaron dicha actividad en 23 aislamientos de un total de 156, a pH 6.5; de los cuales, 12 correspondían a cepas *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. chevalleri*, *S. kluyveri* y *S. bayanus*), y 11 cepas a levaduras no-*Saccharomyces* (*Candida sake*, *C. parapsilosis*, *C. farmata*, *Torulaspota delbruekii*, *Debaryomyces hansenii* y *D. varinjjiae*).

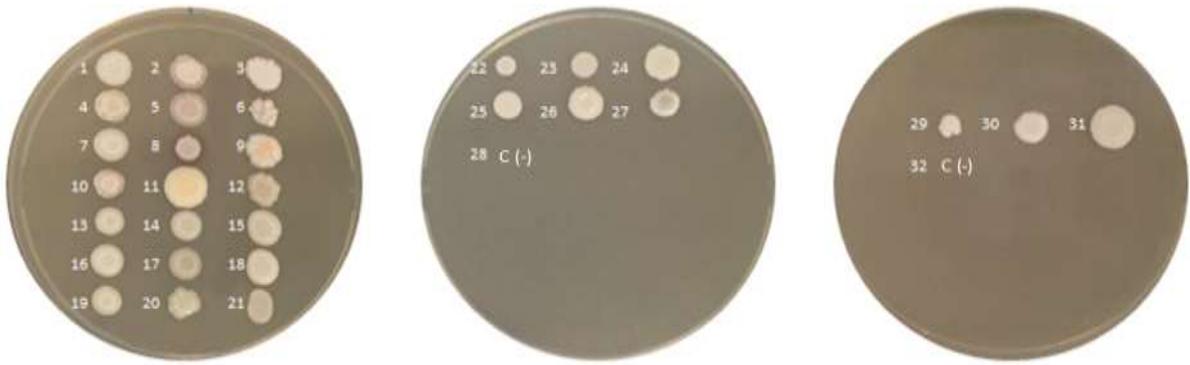
En otro estudio realizado por Belda y col. (2015), observaron que, de un total de 16 especies de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas de ambientes enológicos, solo *Aureobasidium pullulans*, *M. pulcherrima* y *M. fructicola*, mostraron actividad poligalacturonasa. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestros ensayos, podemos decir que coinciden parcialmente con el estudio antes mencionado, ya que sólo observamos expresión de actividad poligalacturonasa en una cepa de levadura cuya especie, presuntivamente del grupo no-*Saccharomyces*, no ha sido aún identificada.

Por otro lado, los resultados que obtuvieron Strauss y col. (2001), en un estudio sobre la producción de enzimas hidrolíticas de 245 aislados de levaduras no-*Saccharomyces*, evidenciaron que sólo 9 aislados no-*Saccharomyces* identificados como *C. stellata*, *C. oleophila*, *C. pulcherrima*, *C. valida* y *K. apiculata* mostraron actividad pectinasa en agar poligacturonato. Estos autores finalmente plantean que la adición de glucosa al medio de cultivo, podría haber inhibido la producción de enzimas en las cepas no-*Saccharomyces* aisladas en su estudio. En concordancia, Gómez García y col. (2005) observaron que cuando se añadió glucosa al medio, la actividad de la enzima se redujo debido al proceso denominado regulación por catabolito, fenómeno que se presenta en otras enzimas hidrolíticas secretadas por patógenos.

En nuestro estudio, y en línea con los estudios realizados por Strauss y col. (2001) y Gómez García y col. (2005), se adicionó 10 g/L de glucosa al medio de cultivo, y la actividad enzimática sólo fue expresada por una cepa no-*Saccharomyces*. La ausencia de esta actividad enzimática en la mayoría de los aislados, podría deberse al fenómeno explicado anteriormente.

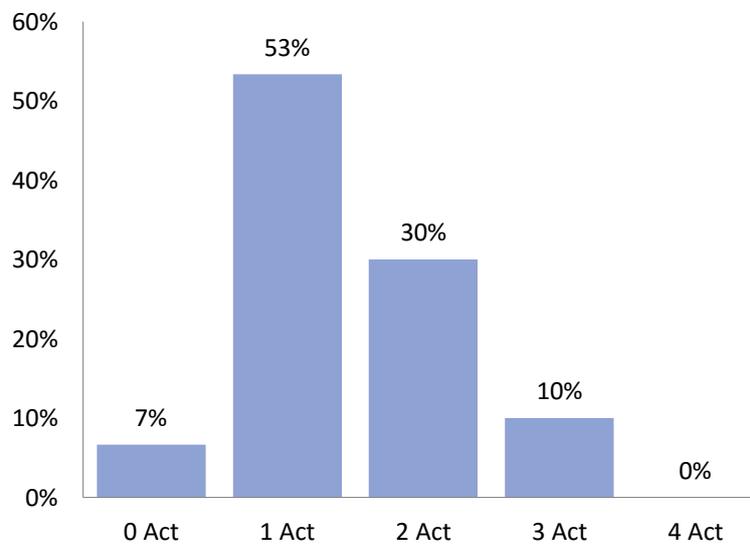
Por el contrario, según reportó McKay (1990), evaluó 33 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en su capacidad de degradar el ácido poligalacturónico. Nueve cepas degradaron el ácido poligalacturónico durante el crecimiento en medio líquido o sólido suplementado con glucosa. Este autor propuso que la secreción de poligalacturonasa por algunas cepas de *S. cerevisiae* es constitutivo, es decir que los genes que codifican para esta actividad enzimática se expresan continuamente.

En la Figura 13 se pueden observar todas las cepas de levaduras utilizadas en este estudio, crecidas en placas con medio YPD con glucosa como fuente de carbono medio que representa el control positivo para todos los ensayos.



**Figura 13.** Colonias de levaduras en medio YPD (control positivo).

En la Figura 14, se observa que el 53% de los aislados, 16 cepas representadas por: 8 cepas no-*Saccharomyces* no identificadas, 4 identificadas como *C. binaria*, *Z. rouxii*, *D. bruxellensis*, *W. anomalus* y 5 cepas *S. cerevisiae*, presentaron solo una actividad enzimática, correspondiente a la secreción de enzima celobiasa en todos los casos. El 30% de los aislados, 6 del grupo no-*Saccharomyces* no identificadas y 3 identificadas como *C. sake*, *D. varinijae* y *W. anomalus*, fueron capaces de expresar las actividades enzimáticas:  $\beta$ -glucosidasa y celobiasa.



**Figura 14.** Porcentaje de cepas que presentaron de 0 a 4 actividades enzimáticas.

El 10%, correspondiente a 3 cepas no-*Saccharomyces* no identificadas presentaron tres actividades enzimáticas, dos de ellas mostraron actividad celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y celobiasa, y la tercera, pectinasa en lugar de celulasa. Por último, el 7% restante, conformado por 2 cepas del grupo no-*Saccharomyces*, no evidenció la expresión de ninguna actividad enzimática, por lo que estas cepas resultaron descartadas para futuros ensayos de caracterización para la degradación de biomasa lignocelulósica (Figura 14).

## 6. CONCLUSIONES

Todos los aislamientos, excepto las cepas INenB2.5 (presuntivamente no-*Saccharomyces*) y *D. bruxellencis*, expresaron al menos una actividad enzimática.

Las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* GRE 2.7; MAI 4 y CPPN 3.3, presentaron el mejor perfil enzimático y continuarán siendo evaluadas para ser utilizadas en la etapa de hidrólisis de la degradación de biomasa lignocelulósica.

Las cepas no-*Saccharomyces* en general evidenciaron mayor actividad enzimática, convirtiéndose así en un interesante grupo de estudio.

Diferentes levaduras utilizadas de manera combinada, podrían mejorar la etapa de hidrólisis enzimática durante la conversión de la biomasa lignocelulósica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Afanasjeva, N., Castillo, L.C., Sinisterr J.C. Biomasa Lignocelulósica. (2017). Parte I: Transformación de biomasa. *Rewiev J. Sci. Technol. Appl.* 3, 27 -43.

Bajpai, P. (2014). Xylan: occurrence and structure. En BajPai P (Ed) *Xylanolytic enzymes*. academic press.

Belancic A, Gunata Z, Vallier MJ, Agosin E (2003)  $\beta$ -Glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces hansenii*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. *J Agric Food Chem.* 51(5),1453–1459.

Belda, I., Conchillo, L. B., Ruiz, J., Navascués, E., Alonso, A., Marquina, D., Santos, A. (2015). Rational selection of yeasts based on their pectinolytic activities and its incidence on technological and sensorial aspects of wine quality. VI European congress of microbiology - FEMS (Maastricht). 2420.

Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. (2016). Unraveling the enzymatic basis of wine “Flavorome”: a phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in microbiology.*7, 1–13.

Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A., Villa, T. G. (1994). Production of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian journal of microbiology.* 40, 974-977.

Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J.P., Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15, 550.

Cáceres, C. X., Cáceres, R. E., Hein, D., Molina, M. G., Pia, J. M. (2012). Biogas production from grape pomace: thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system. *International journal of hydrogen energy* 37, 10111-10117.

Casillas, M. B. (Ed). (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. En: escuela universitaria de ingeniería técnica forestal, Universidad politécnica de Madrid 1-112.

Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., Todd, B.E.N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeast for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian journal of grape and wine research.* 3,2-8.

Corbin, K.R., Hsieh, Y.S.Y., Betts, N.S., Byrt, C.S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G. B., Burton, R. A. (2015). Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource technology* 193, 76–83.

Cordero-Otero, R. R., Ubeda-Iranzo, J. F., Briones-Perez, A. I., Potgieter, N., Villena, 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.

De Vries, R. P., Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews.* 65(4): 497–522.

Dubourdieu, D., Darriet, P., Ollivier, C., Boidron, J.-N. and Ribèreau-Gayon, P. (1988) Rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans l'hydrolyse enzymatique des hétérosides terpéniques du jus de raisin. *Comptes rendus academie des sciences Paris*. 306, 489-493.

Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutierrez, A. R., Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of food science and technology*, 54(6), 1555–1564.

Espinosa-Negrín A.M., López-González, L.M., Casdelo-Gitiérrez, N.L. (2022). Lignocellulosic biomasses pretreatment: a review of the main analytical methods used in its evaluation. *Revista cubana de química*. 34 (1)87-110.

Favaro, L., Basaglia, M., Trento, A., Van Rensburg, E., García-Aparicio, M., Van Zyl, W., Casella, S. (2013). Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. *Biotechnology for biofuel* 6, 168.

Fengel, D., Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin.  
Fernández, M., Di Stefano, R., Briones, A. (2003). Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food microbiology* 20:35-41.

Fernández-González, M., Úbeda, J. F., Vasudevan, T. G., Cordero-Otero, R. R., Briones A. (2004). Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiology letters* 237:261-266.

Fontana, A., Antonioli, A., Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*. 61, 8987–9003.

Food Agriculture Organization (2017). Análisis espacial del balance energético derivado de biomasa Metodología WISDOM Provincia de Mendoza. [http://www.probiomasa.gob.ar/\\_pdf/WISDOM\\_Mendoza\\_FAO%20Final%20170904](http://www.probiomasa.gob.ar/_pdf/WISDOM_Mendoza_FAO%20Final%20170904).

Gomes, F. C., Safar, S. V., Marques, A. R., Medeiros, A. O., Santos, A. R. O., Carvalho, C., Lachance, M. A.; Sampaio, J. P., Rosa, C. A. (2015). The diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* fa, sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 107, 597–611.

Gómez-García, L., Martínez, S. T. (2005). Inducción de dos enzimas pectolíticas en el modelo *Fusarium oxysporum*. *Revista Colombiana de Química*. 34 (1).

Guchu, E.; Ebeler, S. E.; Lee, J.; Mitchell, A. E. (2015) Monitoring selected monomeric polyphenol composition in pre- and post-fermentation products of *Vitis vinifera* L. cv. Airen and cv. Grenache noir. *LWT- Food science technology*. 60, 552-562.

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., Montoya D. (2015). Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: Classical cases and new models. *Revista Iberoamericana de Micología*. 32(1) 1-12.

- Harholt J, Suttangkakul A, Scheller HV (2010). Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* 153(2), 384-95.
- Indiveri, M. E., Pérez, S., Angileri, N., Maroto, C. (2013). Utilización de orujo agotado para la producción de biogás. Séptimo encuentro de investigadores y docentes de ingeniería. En: IDI, San Rafael, Mendoza, Argentina.
- Islam, Z., Zhisheng, Y., Hassan, E. B., Dongdong, C., Hongxun, Z. (2015). Microbial conversion of pyrolytic products to biofuels: a novel and sustainable approach toward second generation biofuels. *Journal industry of microbiology and biotechnology* 42, 1557-1579.
- Jia, J., Wheals, A. E. (2000). Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 38, 264- 270.
- Jimenez, M.; Gonzalez, A.; Martinez, M.; Martinez, A.; Dale, B. (1991). Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose degrading enzyme activities. *Mycological research*, 95, 1299–1302.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H., Bohn, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte chemie international edition*, 44, 3358 – 3393.
- Kurtzman, C. and Fell, J., Eds., (1998). *The yeasts: a taxonomy study*. Elsevier, Amsterdam.
- Law, L., Gutierrez, N. (2013). Butanol production by submerged fermentation of white grape pomace. *Current biotechnology*. 2, 114-116.
- Lynd L. Weimer, P. Zyl, H. Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. 16, 577-583.
- Manzanares, P., Ramon, D., Querol, A. (1999). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of  $\beta$ -D-xylosidase activity. *International journal of food microbiology*. 46, 105-112.
- Maturano, Y. P., Nally, M. C., Toro, M., Castellanos de Figueroa, L., Vazquez, F. (2009). Estudio cualitativo de actividades enzimáticas y fenómeno killer en levaduras vínicas. *Revista enología* N°1 (VI),1-11.
- McKay, A. M. (1990). Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied microbiology* 11, 41–44.
- McMahon, H., Zoecklein, B. W., Fugelsang, K., Jasinski, Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 23,198-203.
- Mendes, J. A. S., Prozil, S. O., Evtuguina, D. V., Cruz Lopes, L. P. (2013). Towards comprehensive utilization of winemaking residues: characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. *Industrial crops and products* 43, 25-32.
- Mendes-Ferreira, A., Climaco, M. C., Mendes-Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components-a preliminary study. *Journal Applied Microbiology* 91: 67-71.

Morales de la Rosa, S., Campos-Martin, J. M. (Eds) (2014). Catalytic processes and catalyst development in biorefining. *Advances in biorefineries: biomass and waste supply chain exploitation*. Elsevier Ltd., 152-198.

Morales de la Rosa, S., García Fierro, J. L., Campos-Martín, J. M. (2015). Method for the hydrolysis of lignocellulosic biomass, in: WO2015/004296 Consejo Superior investigaciones científicas (CSIC).

Nishiyama, Y., Johnson, G., French, A. (2012). Diffraction from non-periodic models of cellulose crystals. *Cellulose*, 19, 319-336.

Nunan, K.J., Sims, I.M., Bacic, A., Robinson, S.P., Fincher, G.B., 1998. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol.* 118, 783–792.

Organización Internacional de la Vid y el Vino (2021). Producción de vino en 2020 - Primeras estimaciones (27.10.2020) <https://www.oiv.int/public/medias/7536/es-produccion-de-vino-primeras-estimaciones-oiv-2020.pdf>.

Özcan, S., Kötter, P., Ciciary, M. (1991). Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. *Applied microbiology and biotechnology*. 36(2), 190-195.

Padilla, B., Gil, J. V., y Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma-complexity. *Frontiers-in-microbiology*. 7, 1–20.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Rubia, T., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5, 53-63.

Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. *Memorias del Instituto de recursos naturales y agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Universidad de Sevilla*.

Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., Cruz Lopes, L. P. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomace. *Industrial crops and products*. 35, 178-184.

Ribeiro, G. O., Gruninger, R. J., Badhan, A., McAllister, T. A. (2016). Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. *Animal frontiers*. 6 (2), 20–26.

Rinaldi R., Palkovits R., Schüth F. (2008). Depolymerization of cellulose using solid catalysts in ionic liquids. *Angew. Chemie international edition*, 47, 8047-8050.

Rinaldi R., Schuth F. (2009). Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes. *ChemSusChem*, 2, 1096-1107.

Robak, K., Balcerek, M. (2018). Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology* 56, 174-187, doi:10.17113/ftb.56.02.18.5428.

Rosi, I., Vinela, M., Domizio, P. (1994). Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of applied bacteriology*. 77, 519-527.

Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454, 841-845.

Sánchez-Riaño, A. M., Gutierrez-Morales, A. I., Muñoz-Hernández, J. A., Rivera-Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. ISSN-e 1909-4841.1 (5), 61-91.

Secretaría de Energía, Ministerio de Economía. Balance Energético 2021 de la República Argentina. (2021). <https://www.argentina.gob.ar/energia/hidrocarburos/balances-energeticos>.

Shariq, M.; Sohail, M. Production of cellulase and xylanase from *Candida tropicalis* (MK-118) on purified and crude substrates. (2020). Pak. J. Bot. 52, 323–328.

Sims, R. E., W. Mabee, J. N. Saddler, y M. Taylor. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. Bioresource technology. 101 (6)1570-1580.

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.

Sorek, N., Yeats, T. H., Szemenyei, H., Youngs, H., Somerville, C. R. (2014). The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. BioScience, 64: 192-201.

Spigno, G., Moncalvo, A., De Faveri, D. M., Silva, A. (2014). Valorization of stalks from different grape cultivars for sugars recovery. Chemical engineering transactions 37, 745-750.

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, 182-190.

Toscano, G., Riva, G., Duca, D., Foppa Pedretti, E., Corinaldesi, F., Rossini, G. (2013). Analysis of the characteristics of the residues of the wine production chain finalized to their industrial and energy recovery. Biomass bioenergy 55, 260–267.

Vasserot, Y., Christiaens, H., Chemardin, P., Arnaud, A., Galzy, P. (1989). Purification and properties of a  $\beta$ -glucosidase of *Hanseniaspora vineae*. Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. Journal applied bacteriology 66, 271-279.

Viñals-Verde, M., Bell-García, A., Michelena-Álvarez, G., Ramil-Mesa, M. (2012). Obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar. 46 (1) 7 – 16.

Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. (2016). The interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast during alcoholic fermentation is species and strain specific. Frontiers in microbiology. 7, 502.

Wyman, C. E. (1999). Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. Annual review of environment 24, 189-226.

Zhang Y. y Lynd L. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. Biotechnology and bioengineering; 88 (7): 797-824.