



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE QUÍMICA



**PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  $\beta$ -GLUCOSIDASAS DE  
CEPAS NATIVAS DE LEVADURA. DISEÑO DE UN  
BIOCATALIZADOR INMOVILIZADO PARA LA MEJORA DE LA  
CALIDAD DE VINOS.**

por

***Paula González Pombo***

TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

**DOCTOR EN QUÍMICA**

DIRECTORES

DRA. BEATRIZ BRENA

PROF. FRANCISCO BATISTA-VIERA

FACULTAD DE QUÍMICA

Cátedra de Bioquímica- Departamento de Biociencias

2010



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Este documento es el resultado del trabajo realizado con ilusión y esfuerzo, un documento que se hizo realidad gracias al acompañamiento, de mis directores de tesis y de todos los compañeros con los que he compartido el laboratorio, los pasillos, los almuerzos, las sobremesas, la mateadas, las charlas, etc.

En primer lugar quiero dar las gracias al Prof. Francisco Batista por haberme dado la oportunidad de participar del mundo de la ciencia y de la investigación, y por haberme apoyado y guiado en mis primeros pasos en la investigación científica durante todos estos años en la Cátedra de Bioquímica.

Especialmente a Beatriz, gracias por su confianza en mi trabajo y por permitirme transitar esta etapa de su mano, con su profesionalismo y rigurosidad. Gracias por su paciencia, por estar siempre dispuesta a compartir sus saberes, y gracias por la inmensa mayoría de todo lo que he aprendido, y en su entusiasmo en mostrarme cuan disfrutable la ciencia puede ser, pero lo que es más importante, gracias por su amistad.

Agradezco también a la Agencia Nacional de Innovación e Investigación (ANII) por la Beca de Posgrado otorgada para culminar esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio, en especial a Carmen y Karen, por su amistad, sus consejos y su apoyo incondicional, a Laura, Cecilia y Miriam por acompañarme durante todos estos años y por todos los momentos que hemos compartido juntas. A Gaby, por estar siempre a mi lado apoyándome y brindándome su amistad.

A Vale y Lore, por nuestra amistad y por todos los momentos que compartimos juntas, muchos de ellos a pesar de la distancia.

A todas las personas que me han ayudado en el desempeño de esta tesis multidisciplinaria, a los integrantes del Laboratorio de Enología de Facultad de Química, especialmente a Laura Fariña por ayudarme con la parte “aromática” de esta tesis. A Adriana Gámbaro por su disponibilidad y su gran ayuda en la planificación de los estudios sensoriales con el vino. A Carina Gaggero y Marianne Barquet del Depto de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, por la identificación de las cepas de levadura.

Por último quiero agradecer a mi familia, por inculcarme valores basados en el amor, trabajo y constancia, tan necesarios para cualquier aspecto de la vida, y especialmente a mi madre por su apoyo incondicional.

A mi marido y mis dos hijos, agradecerles su cariño, por acompañarme y por el tiempo que me han concedido.

A todos, gracias, gracias, gracias.



# ***INDICE GENERAL***

---

<i>ABREVIATURAS</i> .....	<i>i</i>
<i>RESUMEN</i> .....	<i>iii</i>
<b><i>INTRODUCCION</i></b> .....	<b><i>1</i></b>
1. El aroma del vino.....	1
1.1 <i>Aromas varietales</i> .....	4
El aroma varietal es el responsable de la tipicidad de los vinos. ....	4
Pirazinas .....	5
1.2 <i>Compuestos Isoprenoides</i> .....	5
Origen de los terpenos .....	7
La mayoría de los terpenos se encuentran como glicósidos.....	8
Estructura de los glicósidos terpénicos .....	8
La hidrólisis enzimática .....	10
Mecanismo de hidrólisis secuencial .....	11
1.3 <i>Carotenoides y derivados C<sub>13</sub> norisoprenoides</i> .....	13
1.4 <i>Percepción del aroma; el concepto de “flavor”</i> .....	13
1.5 <i>Cuantificación de los compuestos aromáticos libres y ligados</i> .....	15
Extracción con cartucho isolute env+ .....	16
Índice glicosil-glucosa (G-G).....	17
2. $\beta$ -D-Glucosidasas.....	18
2.1 <i>El origen y las propiedades de <math>\beta</math>-glucosidasas</i> .....	19
$\beta$ -Glucosidasas de plantas.....	19
$\beta$ -Glucosidasas microbianas .....	21
$\beta$ -Glucosidasas bacterianas.....	21
$\beta$ -Glucosidasas en hongos filamentosos .....	21
$\beta$ -Glucosidasas de levadura.....	22
$\beta$ -Glucosidasas de cepas no-saccharomyces.....	24
2.2 <i>Estructura de las glicosidasas</i> .....	25
3. Inmovilización de enzimas .....	26
3.1 <i>Inmovilización de <math>\beta</math>-glucosidasas</i> .....	34

<b>JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</b> .....	37
<b>MATERIALES</b> .....	39
<b>MÉTODOS</b> .....	39
Screening de actividad $\beta$ -glucosidasa.....	39
Identificación .....	40
Condiciones de cultivo .....	40
Aislamiento de $\beta$ -glucosidasa .....	40
Ensayo de actividad enzimática .....	40
Determinación de proteínas .....	41
Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	41
Síntesis del gel mana-agarosa (mono-amino-etil-n-amino-etil) .....	41
Purificación e inmovilización en gel amino-agarosa .....	42
Modificación del nanoambiente.....	42
Inmovilización covalente sobre soportes epóxido .....	43
Prueba de liberación de enzima (“leakage”).....	44
Estudios de estabilidad en diferentes condiciones .....	44
Aislamiento de compuestos volátiles y glicósidos en vino.....	44
Actividad $\beta$ -glucosidasa sobre los glicósidos aislados .....	45
Tratamiento enzimático del vino .....	45
Determinación del índice glicosil-glucosa (G-G) .....	46
Identificación de los compuestos aromáticos .....	47
Cuantificación de los compuestos aromáticos .....	48
Pruebas sensoriales: test triangular .....	48
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	51
<b>1. Selección e identificación de cepas con actividad <math>\beta</math>-glucosidas..</b>	51
Screening de actividad $\beta$ -glucosidasa.....	51
Identificación de cepas no- <i>saccharomyces</i> .....	53
Curvas de crecimiento y producción de $\beta$ -glucosidasas de las cepas .....	53
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	53
<i>Issatschenkia terricola</i> .....	54

<i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	54
<b>2. <math>\beta</math>-Glucosidasas de <i>Metschnikowia pulcherrima</i></b> .....	54
Purificación e inmovilización de $\beta$ -glucosidasa.....	55
Propiedades de la $\beta$ -glucosidasa purificada de <i>M. Pulcherrima</i> .....	57
Modificación del nano-ambiente.....	63
Actividad del derivado sobre los glicosídeos aislados de vino Moscatel .....	65
<b>3. <math>\beta</math>-Glucosidasa de <i>Issatschenkia terricola</i></b> .....	67
Aislamiento de $\beta$ -glucosidasa extracelular .....	668
Inmovilización de $\beta$ -glucosidasa en eupergit c.....	69
Caracterización de la $\beta$ -glucosidasa de <i>I. terricola</i> .....	69
La inmovilización estabiliza la $\beta$ -glucosidasas.....	72
Aplicación del derivado en aromatización de vino blanco Moscatel.....	74
Posible rol y aplicación de la $\beta$ -glucosidasa de <i>I. terricola</i> en enología. ....	75
<b>4. Glicosidasas de <i>Aspergillus niger</i></b> .....	75
Optimización del proceso de inmovilización.....	78
Actividad y estabilidad del biocatalizador inmovilizado .....	82
El índice G-G disminuye por la actividad del derivado. ....	83
Hidrólisis de compuestos glicosilados del vino.....	84
<b>5. Aromatización de vino Moscatel joven</b> .....	86
Liberación de compuestos aromáticos volátiles en vino Moscatel .....	88
Especificidad de la $\beta$ -glucosidasa .....	91
Estudio sensorial del aroma del vino moscatel .....	92
Relación entre datos sensoriales y los instrumentales. ....	94
<b>CONCLUSIONES</b> .....	97
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	101
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS</b> .....	115



**ABREVIATURAS**

---

pNP	<i>p</i> -nitrofenil-glicósidos
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -Dglucopiranosido
pNPR	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -L- ramnopiranosido
pNPA	<i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosido
MUG	4-metil- $\beta$ -umbeliferil- $\beta$ -D-glucosido
MANA-agarosa o Amino-agarosa	Mono-amino-etil-N-amino-etil
B-Glu- <i>M.pulcherrima</i> -Agarosa	Derivado enzimático adsorbido sobre soporte Amino-agarosa.
B-Glu- <i>M.pulcherrima</i> -Agarosa-PAL-PAM	Derivado enzimático adsorbido sobre soporte Amino-agarosa y recubierto con poliamina y polidextrano.
$\beta$ -glu- <i>I.terricola</i> -Eupergit	Derivado enzimático sobre soporte Eupergit
Glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit	Derivado enzimático sobre soporte Eupergit
G-G	Glicosil-Glucosa
BG	$\beta$ - glucosidasa
Ara	$\alpha$ -arabinosidasa
Ra	$\alpha$ -ramnosidasa
TMAB	Trimetilaminoborano
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
HRGC	Cromatografía gaseosa de alta resolución
FID	Detector de ionización de llama
PAGE	Electroforesis en geles poliacrilamida en condiciones nativa
SDS-PAGE	Electroforesis en geles poliacrilamida en condiciones desnaturalizante
IEF	Isoelectroenfoque
UE	Unidad de enzima



## **RESUMEN**

---

La tipicidad aromática de los vinos está determinada por la variedad de vid utilizada así como por los procesos químicos y biológicos que se desarrollan durante el proceso de vinificación y añejamiento. En especial, el desarrollo de los aromas depende en gran parte de la existencia durante la elaboración del vino, de enzimas capaces de actuar eficientemente sobre los sustratos glicosídicos existentes, generando compuestos volátiles. Debido a que muy pocas de las cepas de levaduras encontradas en los procesos de vinificación producen enzimas estables y activas en esas condiciones, existe un gran interés en la caracterización de nuevos biocatalizadores así como de un mejor conocimiento de las variables que determinan el proceso de desarrollo de aromas en vinos.

En el presente trabajo se abordaron aspectos relacionados con el aislamiento, caracterización e inmovilización de  $\beta$ -glucosidasas de cepas de levaduras autóctonas aisladas de mostos y uvas provenientes de viñedos uruguayos, así como el estudio de su comportamiento en la liberación de aromas en un vino joven. Se estudiaron en particular las  $\beta$ -glucosidasas provenientes de tres cepas no-*Saccharomyces*: *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatschenkia terricola* y *Hanseniaspora uvarum*.

Mediante diversas estrategias se desarrollaron biocatalizadores inmovilizados de  $\beta$ -glucosidasas y se estudió su estabilización mediante estrategias tales como la modificación del nano-ambiente que rodea la enzima, con la finalidad de obtener biocatalizadores activos y estables en condiciones de pH ácido y concentración de etanol similar al presente en vinos.

Particularmente, se destaca el desarrollo del biocatalizador inmovilizado de  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* que presenta propiedades muy convenientes y buena funcionalidad en vino, con una buena estabilidad de almacenamiento y además una vida media muy competitiva en condiciones enológicas, que permite su aplicación en vinos. Su utilización hace posible un mejor control del proceso de hidrólisis lo cual es muy importante para el tratamiento de los vinos jóvenes, ya que permite una liberación rápida y controlada de terpenos y otros compuestos, facilitando la

venta rápida del producto, conservando una fracción de aromas ligados como reserva aromática potencial, a ser liberada en el tiempo.

Se caracterizó la actividad enzimática de este derivado sobre los precursores aromáticos presentes en un vino blanco Moscatel, en comparación con la correspondiente actividad de un biocatalizador inmovilizado obtenido a partir de un preparado comercial de glicosidasas de *Aspergillus oryzae*. Se identificaron y cuantificaron los compuestos liberados y se evaluó el impacto sensorial de ambos tratamientos enzimáticos en las propiedades aromáticas del mismo. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que hay un importante incremento de los terpenos y norisoprenoides en los vinos tratados enzimáticamente con respecto al vino control. Particularmente la concentración de norisoprenoides fue mayor en el vino tratado con la  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada de *I. terricola*. Se destaca la diferencia en especificidad que presenta dicha  $\beta$ -glucosidasa en relación a las glicosidasas comerciales de *A. niger* estudiadas, que determinan propiedades sensoriales diferenciables en los vinos tratados con estas enzimas. Esta especificidad podría ser la responsable de aportar cierta complejidad aromática en los vinos blancos jóvenes en los cuales no es habitual encontrar los compuestos mencionados anteriormente.

Se pretende con este trabajo contribuir al mejor conocimiento del potencial existente en enzimas de la flora autóctona, lo que a su vez permitirá evaluar el rol de la especificidad de estas enzimas en el desarrollo del perfil aromático de los vinos y generar las bases para estudiar la posible utilización enológica de las  $\beta$ -glucosidasas.

## ***INTRODUCCION***

---

### **1. El aroma del vino.**

El aroma del vino está formado por una mezcla de compuestos de gran complejidad debido a que es el resultado de una larga secuencia biológica, bioquímica y tecnológica que ocurre a lo largo de todo el proceso de vinificación desde la viña hasta la crianza. Esta complejidad es debida al elevado número de componentes volátiles que están involucrados, en concentraciones que varían desde algunos ng/L hasta mg/L (Bayonove et al., 1998; Rapp y Mandery, 1986). Además, la complejidad aromática está relacionada con la diversidad de mecanismos que intervienen en su génesis tales como: 1) el propio metabolismo de la uva dependiente de la variedad, del suelo, del clima y de las prácticas vitivinícolas; 2) los fenómenos bioquímicos pre-fermentativos (oxidación e hidrólisis); 3) la fermentación alcohólica y maloláctica generadora de diversos metabolitos; 4) las reacciones químicas y enzimáticas post-fermentativas, que intervienen en el proceso de conservación y envejecimiento del vino.

La importancia del aroma en la calidad del vino ha hecho que numerosos grupos de investigación hayan dedicado su esfuerzo a conocer la composición cualitativa del mismo (Etievant, 1991; Guth, 1997; Ferreira et al., 2002; Escudero et al., 2000). Como se ha partido de la base de que las moléculas responsables del aroma son volátiles, la investigación se ha centrado durante muchísimo tiempo en tratar de identificar todos los compuestos volátiles. Sin embargo, la volatilidad de una sustancia no implica que tenga propiedades aromáticas. Actualmente, se han podido separar y analizar alrededor de 1000 compuestos volátiles diferentes. Estos compuestos volátiles están formando parte del vino en una solución hidroalcohólica, que contiene otros compuestos de características muy variadas (neutros, iónicos y macromoléculas), representando entonces una matriz muy compleja. Si todos los compuestos volátiles contribuyesen al aroma de un vino sería prácticamente imposible el intentar comprender su aroma, y no merecería la pena el trabajar en este tema. Pero, afortunadamente, de esa multitud de

compuestos sólo unos pocos, alrededor de unos cientos se saben que pueden contribuir de forma neta al aroma del vino (Guth, 1997; Ferreira et al., 1998; López, et al., 1999; Kotseridis y Baumes, 2000). El análisis de los compuestos responsables del aroma se lleva a cabo por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y por olfatometría. Precisamente el empleo de esta modalidad de detección fue la que revolucionó el estudio del aroma del vino (Etievant, 1991; Guth, 1997; Ferreira et al., 2002).

Tradicionalmente los aromas se han clasificado en cuatro grupos: aromas varietales, pre-fermentativos, fermentativos, y aromas post-fermentativos.

### **Clasificación de los aromas**

#### ***a) Aromas varietales***

Proviene de la propia uva y son característicos de cada variedad y modificables según las características del terroir y el manejo del viñedo. Son los compuestos que le dan tipicidad a los distintos cepajes y se dividen en: 1) aromas libres (volátiles), presentes en el grano, fuertemente odoríferos y que se pueden percibir directamente por degustación de la baya y 2) precursores de aroma que existen en el grano en forma ligada (no volátil), por lo tanto son inodoros y se manifiestan en el vino a través de diversas reacciones químicas o enzimáticas al liberar la molécula aromática.

#### ***b) Aromas pre-fermentativos***

Se producen durante los tratamientos realizados a la uva desde la etapa de la cosecha hasta inicios de la fermentación (cosecha, transporte, descobajado, estrujado y prensado). Son generados esencialmente por reacciones enzimáticas o químicas a partir de precursores presentes en la uva. Los efectos mecánicos del estrujado en esta etapa producen una ruptura a nivel celular que permite que los sistemas enzimáticos entren en contacto con los sustratos presentes en el grano (Bayonove et al., 1998).

***c) Aromas fermentativos***

Se generan por las levaduras en la fermentación alcohólica y las bacterias lácticas en la fermentación maloláctica. Tenemos que distinguir dentro de estos, dos tipos de aromas;

- aquellos producidos por la levadura a partir de su metabolismo dando origen a vinos muy alcohólicos, con fuerza, a veces a expensas de la finura o elegancia (vinosidad).
- los aromas producidos por la levadura y en menor intensidad por las bacterias lácticas a partir de los precursores de aroma de la uva; son los responsables de la “tipicidad” del vino.

Los compuestos químicos responsables del aroma del vino en esta etapa comprenden principalmente a alcoholes, ácidos grasos y sus ésteres, aldehídos, compuestos azufrados, lactonas, compuestos carbonílicos, compuestos nitrogenados y fenoles volátiles. Aunque estos compuestos son encontrados en la mayoría de los vinos, el tipo de producción que se realice puede producir importantes cambios en su concentración y dar origen a variaciones aromáticas en ciertos tipos de vinos (Boido et al., 2003).

***d) Aromas post-fermentativos***

Son generados durante el proceso de conservación y crianza de los vinos a partir de precursores de aromas por vía enzimática o hidrólisis ácida y también a partir de transformaciones de otros compuestos. Según el sistema de añejamiento los aromas sufrirán notables cambios por procesos biológicos y fisicoquímicos. El proceso de crianza puede ser llevado a cabo en un ambiente reductor (la botella) o en un ambiente oxidativo (la bodega), obteniéndose diferentes resultados. Se supone que al finalizar esta etapa, el vino ha alcanzado un equilibrio final caracterizado por aromas delicados y penetrantes. Este equilibrio se logra a través de la transformación de compuestos volátiles durante la conservación, en la cual se da la disminución de los aromas frutados característicos de los vinos jóvenes evolucionando hacia aromas más complejos (Gonzalez-Viñas et al., 1998; Perez-Coello et al., 1999). Las principales modificaciones sobre los componentes volátiles involucran a los ésteres,

terpenos, norisoprenoides, fenoles volátiles, compuestos azufrados y compuestos derivados del furfural.

Por lo tanto, el origen de los aromas del vino es muy variado y según sea su origen son responsables de notas de tipicidad, vinosidad y complejidad en el vino (Figura1).

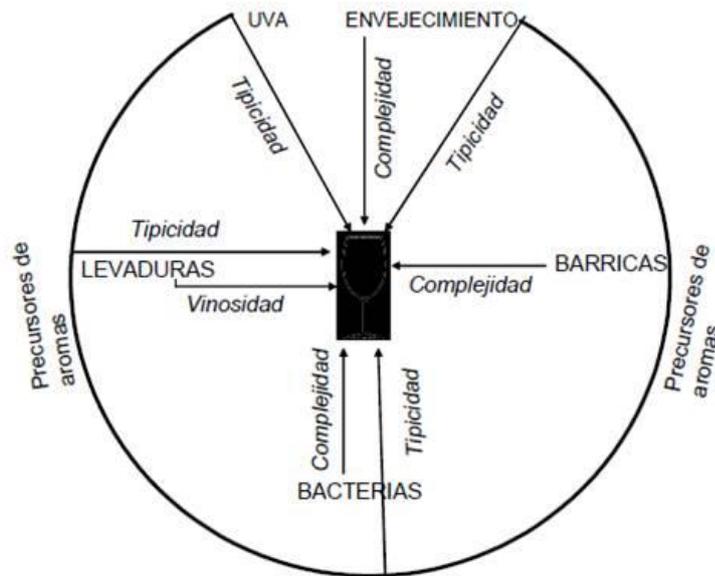


Figura 1. El origen de los aromas del vino y su participación en la tipicidad, vinosidad y complejidad. (Catania y Avagnina, 2007)

## 1.1. Aromas varietales

**El aroma varietal es el responsable de la tipicidad de los vinos.**

Entre todos los componentes del aroma los más importantes para la tipicidad y calidad de un vino son los aromas aportados por la variedad (Riberau-Gayon et al., 1998). Estos compuestos son característicos de la variedad *Vitis vinífera* (vid) considerada y su expresión depende también de otros factores (fitosanitarios, climáticos, conducción de la viña, etc). Las sustancias ligadas con la tipicidad aromática pertenecen esencialmente a dos familias químicas: las **pirazinas** y los **terpenos**.

Si bien la mayoría de las variedades de uva son poco aromáticas, permiten elaborar vinos de gran reputación en donde la particularidad de su aroma juega un rol destacado. Esto se debe a que una parte mayoritaria de los aromas varietales se encuentra en forma de precursores, como es el caso de los compuestos glicosilados, carotenoides, ácidos fenólicos, y precursores de aromas azufrados.

Existen también otros compuestos bajo la forma de precursores glicosilados que intervienen en el aroma varietal: los norisoprenoides. Estos no son considerados en sentido estricto como terpenos, ya que son el resultado de la degradación química o enzimática de los carotenoides presentes en la uva.

Es importante destacar que los mismos compuestos aromáticos se encuentran en variedades de uvas diferentes, y la personalidad aromática es la consecuencia de diferentes combinaciones de las concentraciones de estos compuestos, la que se ve reflejada posteriormente en el vino.

### **Pirazinas**

La concentración de estos compuestos presenta una correlación positiva con las notas herbáceas y han sido reportados en vinos de diversas variedades tales como Merlot, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc (Heyman et al., 1986; Bayovone et al., 1998). Si bien las concentraciones encontradas son muy bajas (0.4 a 50 ng/L), las mismas son muy superiores a sus umbrales de percepción. Es un fuerte aroma primario que no se modifica en el transcurso de la vinificación, originándose a partir de aminoácidos (Murrey y Whitfield, 1975).

## **1.2. Compuestos Isoprenoides**

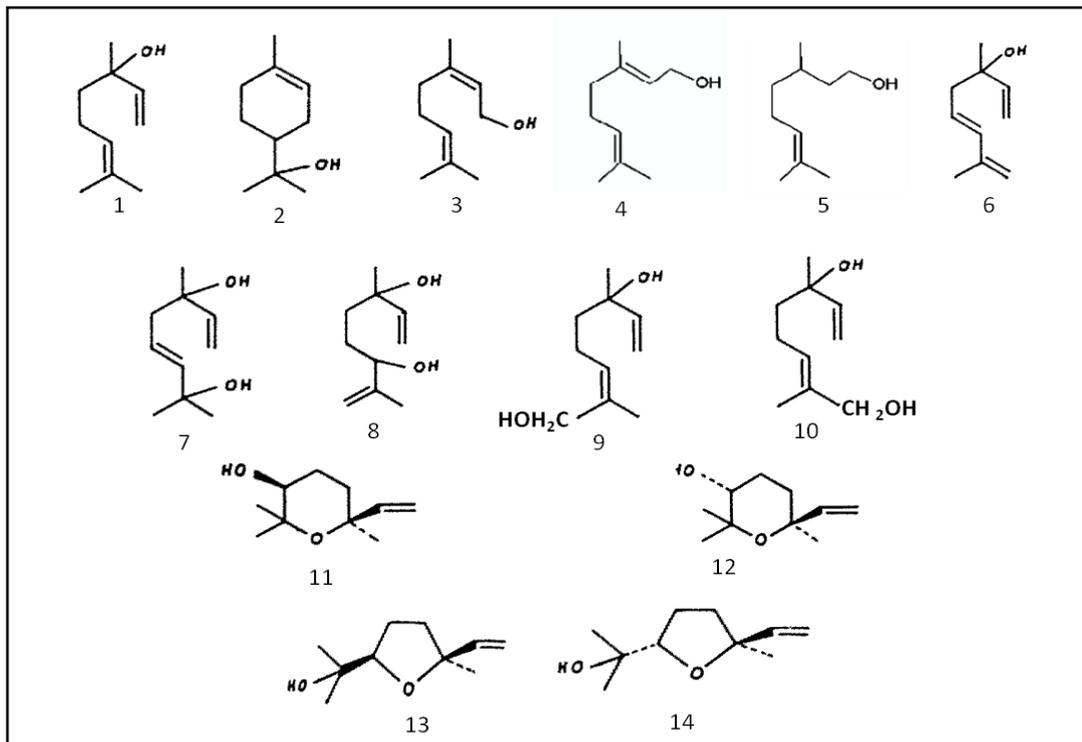
Son considerados los constituyentes principales de los aceites esenciales y resinas de plantas superiores, y constituyen uno de los mayores grupos y más diversos de compuestos naturales. Son constituyentes secundarios de las plantas y su biosíntesis se inicia a partir de la acetilcoenzima A.

Los terpenos constituyen un buen ejemplo de sustancias de origen varietal que intervienen en la tipicidad de los moscateles y de las cepas aromáticas

(Gewurztraminer) pero también se encuentran en el aroma de los vinos de otras variedades (Marais, 1983; Riberaeau-Gayon et al., 1975; Strauss et al., 1986; Versini et al., 1999; Bayonove, 1993).

Al presente, en la uva y en el vino se han identificado alrededor de 70 compuestos terpénicos (Bayonove et al., 1998; Mateo y Jimenez, 2000; Strauss et al., 1986). Los más conocidos de estos compuestos son los siguientes (Figura 2):

- a) Hidrocarburos monoterpénicos (C<sub>10</sub>) como el limoneno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, p-cimeno y mirceno, o sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) como farneseno y  $\gamma$ -cadineno, con aromas poco interesantes.
- b) Alcoholes monoterpénicos, generalmente muy aromáticos y entre ellos están: el linalol,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol, citronerol, hotrienol que se encuentran en mayor o menor cantidad en todas las cepas.
- c) Alcoholes sesquiterpénicos como el farnesol y  $\gamma$ -cadinol.
- d) Numerosos óxidos, formas cis y trans de los óxidos furánicos y piránicos de linalol, óxido de rosa y óxido de nerol, que son mucho menos aromáticos que los precedentes terpenos.
- e) Algunos aldehídos como el geranial, neral, citroneral, son muy aromáticos pero bastante más agresivos que sus correspondientes alcoholes.
- f) El ácido transgeránico, al igual que algunos esterres como el geranil acetato y el neril acetato (Versini et al., 1994).
- g) Los dioles terpénicos, que debido a las funciones alcohol adicional son más solubles pero también menos aromáticos.



**Figura 2. Principales monoterpenos presentes en uvas.**

Alcoholes monoterpénicos: (1) linalol; (2),  $\alpha$ -terpineol (3), nerol (4), geraniol (5), citronerol (6) ho-trienol.

Dioles terpénicos: (7) trans-3,7-dimetil-1,5-octadien-3,7 diol; (8) trans-3,7-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol; (9) cis-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol; (10) trans-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol.

Óxidos terpénicos: (11 y 12) formas cis y trans de los óxidos piránicos de linalol; (13 y 14), formas cis y trans de los óxidos furánicos de linalol.

## Origen de los terpenos

Dada la existencia de estos compuestos en muchas especies del reino vegetal, su biosíntesis ha sido muy estudiada, habiéndose demostrado que tiene lugar en diferentes compartimentos celulares mediante rutas biosintéticas distintas.

Una de estas rutas se desarrolla en el citoplasma, en la cual la glucosa pasa en una primera instancia a ácido mevalónico y luego a isopentil pirofosfato, con acetil-CoA como producto intermedio. Por condensación de unidades de isopreno es que se obtienen los diferentes derivados terpénicos. Al unirse 3 unidades se obtienen los sesquiterpenos de 15 carbonos y al unirse 2 sesquiterpenos se obtienen los triterpenos de 30 carbonos (Bayonove et al., 1998; Vasserot et al., 1995).

La otra ruta biosintética ocurre en los plástidos por unión de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, mediante la vía de la 5-fosfato-1-deoxi-D-xilulosa, formándose isopentil pirofosfato, a partir del cual, como en la ruta anterior, por condensación se obtienen los monoterpenos, diterpenos y carotenos (Eisenreich et al., 1997, Lichtenthaler et al., 1997; Rohmer et al., 1996; Schwender et al., 1997).

### **La mayoría de los terpenos se encuentran como glicósidos y no son aromáticos.**

En los últimos años se ha visto que una importante porción de los compuestos terpénicos se encuentra ligada en forma de glicósidos, los cuales por no ser volátiles no contribuyen directamente al aroma. Este tipo de compuestos aromáticos glicosilados está presente en una gran variedad de frutas y particularmente en uvas, lo que ha despertado un gran interés en la industria vitivinícola (Williams et al., 1982; Gunata et al., 1985).

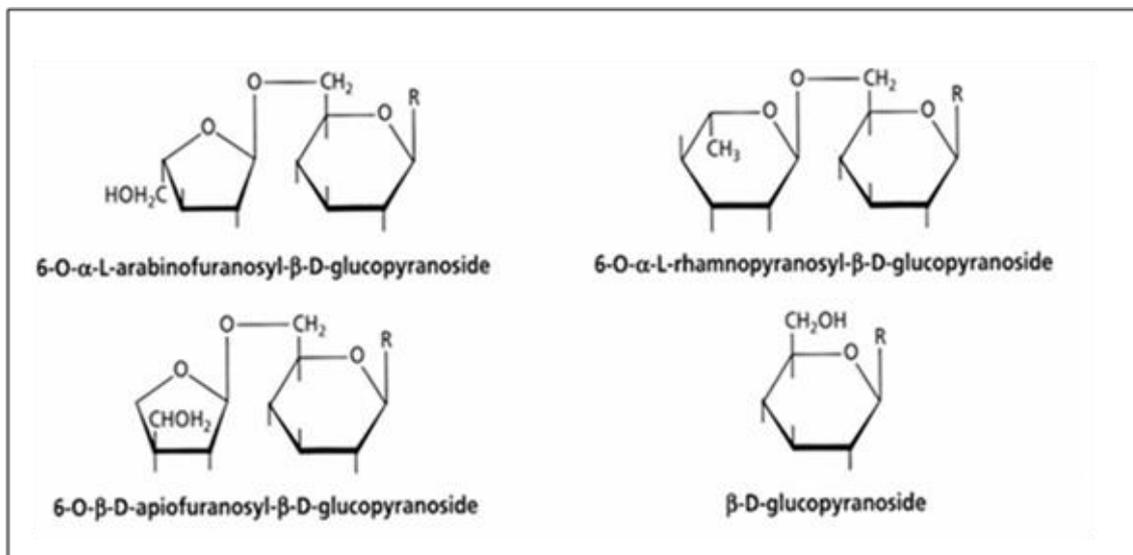
Los precursores glicosilados son muy numerosos y relativamente abundantes. La mayor parte de las variedades de uvas presentan simultáneamente formas libres del aroma (terpenos) y glicósidos. Estos últimos son en general los más abundantes y los más importantes dado las propiedades sensoriales que presenta la aglicona una vez que esta es liberada de la molécula de azúcar a la cual está unida (Vasserot et al., 1995; Dimitriadis y Williams, 1984; Gunata et al., 1985). Este potencial es relativamente estable durante la vinificación, permaneciendo inalterado en los vinos jóvenes y evoluciona lentamente a lo largo del tiempo (Gunata et al., 1985; Gunata et al., 1990; Voirin, 1990; Williams et al., 1992).

### **Estructura de los glicósidos terpénicos**

La estructura de los glicósidos de agliconas terpénicas es ahora bastante bien conocida. El monoterpeno básico, con 10 átomos de carbono y 16 de hidrógeno ( $C_{10}H_{16}$ ), puede orientarse y unirse de muchas maneras distintas, lo que resulta en una gran diversidad de compuestos.

Las agliconas involucradas en la síntesis de los glicósidos de monoterpenos se clasifican en 4 grupos: monoterpenoles acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e

irregulares. En la uva, los glicósidos se encuentran en mayor proporción en la piel que en la pulpa y el jugo, y su distribución entre pulpa y piel varía de una cepa a otra (Gunata et al., 1985; Wilson et al., 1986). Se ha identificado tanto en uvas como en vinos, la aglicona ligada a una molécula de glucosa ( $\beta$ -D-glicósidos), o a disacáridos formando el **arabinoglucopiranosido**, **ramnoglucopiranosido**, y **apioglucopiranosido** (Figura 3) (Williams et al., 1982; Voirin et al., 1990; Gunata et al., 1988; Vasserot et al., 1995). Un análisis más minucioso demostró que no todos los glicósidos están presentes en todas las variedades estudiadas y que su proporción puede variar de una variedad a otra (Bayonove et al., 1993).



**Figura 3. Diferentes formas de glicósidos terpénicos (o de norisoprenoídes) de la uva. R = terpenol o C13 norisoprenoide. (Gunata et al., 1993)**

Todas las variedades de uvas presentan, en mayor o menor concentración, los glicósidos mencionados anteriormente, pero las variedades Moscatel son las más ricas en estos compuestos alcanzando concentraciones muy elevadas que van desde 6,5 hasta 28 mg/L de jugo (Voirin et al., 1990). Las agliconas correspondientes encontradas en numerosas variedades de uvas (Moscatel, Gewurztraminer, Rielsing o Chardonnay) son principalmente geraniol, nerol, linalol y en menor proporción  $\alpha$ -terpineol, citronerol y hotrienol (Williams et al., 1982; Gunata et al., 1985; Versini et al., 1999). Si bien la parte aglicona está a menudo formada por terpenoles, también pueden encontrarse otros precursores

aromáticos tales como óxidos de linalol, dioles y trioles terpénicos, así como también alcoholes lineales o cíclicos, C13 norisoprenoides y ácido fenólico. Dado que las agliconas son muy diversas, se puede obtener un número enorme de compuestos (Bayonove et al., 1998; Voirin, 1990). El carácter varietal de un vino está determinado por la mezcla de estos compuestos, más que por la influencia de un compuesto individual (Ribereau-Gayon et al., 1998).

### **La hidrólisis enzimática es la mejor opción para liberar a los monoterpenos a partir de sus precursores glicosilados.**

Durante y luego de la fermentación alcohólica, parte de los precursores aromáticos glicosilados son liberados debido a su eficiente hidrólisis. Este proceso ocurre por dos mecanismos de **hidrólisis: ácida** y **enzimática**. Dada la alta especificidad que presentan las enzimas, la hidrólisis enzimática permite liberar los terpenos unidos a los residuos glicosídicos más rápidamente y de forma selectiva, sin ocasionar alteraciones estructurales a los monoterpenos, desarrollando así, un aroma más natural. En la hidrólisis ácida, que se da naturalmente en los vinos durante el añejamiento debido a su pH ácido, las agliconas liberadas pueden sufrir una serie de modificaciones dando lugar a productos secundarios no deseados generando vinos con menor fragancia (Gunata et al., 1988; Gunata et al., 1993). Existen diferencias sensoriales significativas entre los volátiles liberados a partir de precursores mediante hidrólisis enzimática en comparación con los obtenidos por hidrólisis ácida (Abott et al., 1991).

### ***La hidrólisis ácida produce aromas no deseados***

Las condiciones ácidas que se dan durante la vinificación y el proceso de añejamiento del vino, hacen que los precursores aromáticos sufran un proceso natural de hidrólisis química, mediante la ruptura del enlace glicosídico, ocasionando la liberación de los monoterpenos aromáticos (Sefton et al., 1993). Bajo las condiciones ácidas encontradas en los vinos (pH 2,5-3,8) estos monoterpenos pueden convertirse en compuestos menos aromáticos los cuales pueden tener un efecto muy significativo en el aroma del vino, teniendo un

impacto menor en el desarrollo de las características varietales de los vinos jóvenes. Además, dependiendo del pH al que se encuentre el jugo, se dan diferencias significativas en los monoterpenos volátiles que se van formando (Williams et al., 1982). Otra desventaja de la hidrólisis ácida es que es que se trata de un proceso muy lento, que ocurre a lo largo del proceso de vinificación (Palmeri y Spagna, 2007).

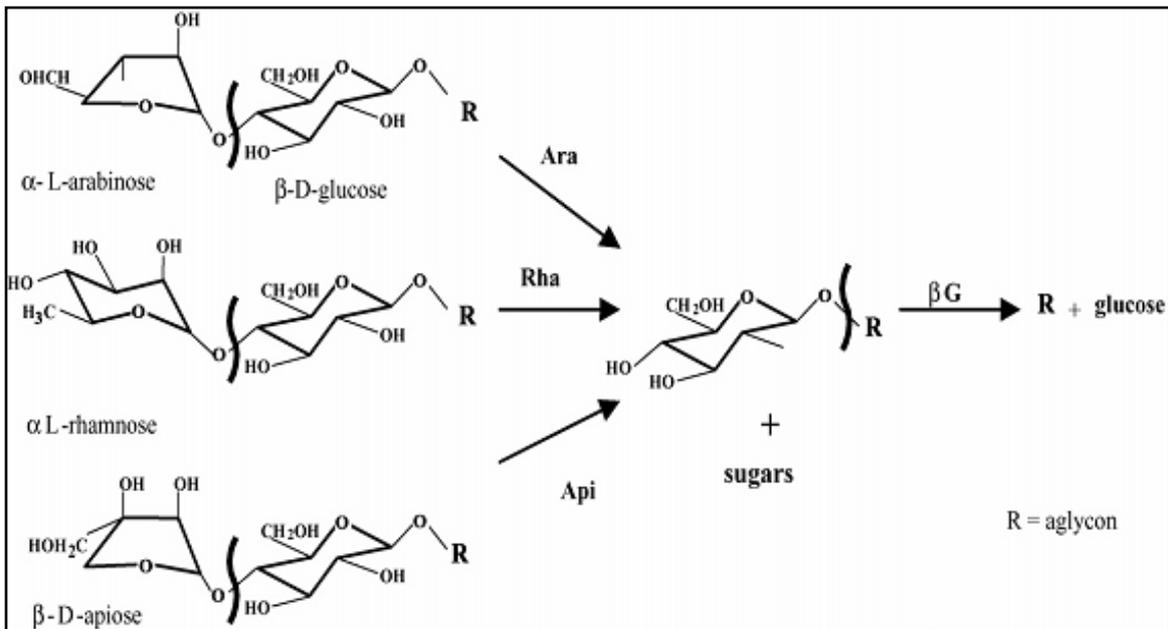
### ***La hidrólisis enzimática produce un aroma “más natural”***

En los últimos años la industria de alimentos ha demostrado gran interés en las enzimas y en especial el sector vitivinícola ha dirigido su atención a las pectinasas y glicosidasas (Lambrechts y Pretorius, 2000). La hidrólisis enzimática parece ser una muy buena opción para liberar terpenos de forma “más natural”, característica altamente buscada en los vinos de calidad (Cordonnier y Bayonove, 1974; Mateo y Jimenez, 2000).

### **Mecanismo de hidrólisis secuencial llevado a cabo por glicosidasas**

Las glicosidasas promueven la liberación de precursores aromáticos en el vino, generalmente a partir de glicósidos terpénicos, responsables del carácter varietal de muchas uvas.

Gunata et al. (1988) han estudiado el mecanismo secuencial en donde tiene lugar la hidrólisis de los glicósidos disacarídicos; primero, el enlace (1-6) inter-azúcar se escinde por una exo-glicosidasa resultando la liberación de  $\alpha$ -L-ramnosa,  $\alpha$ -L-arabinosa o la  $\beta$ -D-apiosa y los correspondientes  $\beta$ -D-glicósidos y luego, una  $\beta$ -glucosidasa actúa sobre el monoterpenol- $\beta$ -D-glicósido, liberando el monoterpeno y la  $\beta$ -D-glucosa (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismo de hidrólisis secuencial de glicosidasas. Ara: α-L arabinofuranosidasa; Rha: α-L-rannopiranosidasa; Api: β-D-apiofuranosidasa; βG: β-D-glucopiranosidasa. R = monoterpenos, sesquiterpenos, norisoprenoides, derivados del benceno, alcoholes alifáticos.**

Una característica en común de las β-glicosidasas es que en general no presentan actividad endoglicosidasa es decir, solamente son capaces de actuar sobre los monoglucósidos liberando el monosacárido (glucosa). Sin embargo, se ha demostrado la existencia de una endoglicosidasa en la piel de uva capaz de hidrolizar por sí sola el enlace glicosídico y liberar en una etapa el disacárido de la aglicona correspondiente (Gunata et al., 1998).

Para que estas enzimas puedan ser utilizadas en las condiciones enológicas, deben presentar ciertos requisitos. Primeramente, deben tener alta afinidad por las agliconas terpénicas presentes en uvas. Segundo, deben ser activas al pH del vino. Tercero, no deben ser inhibidas por glucosa, deben ser tolerantes al etanol y activas a la temperatura de elaboración de los vinos (10-30°C). Las concentraciones de monoterpenos y el aroma de los vinos pueden incrementarse significativamente en vinos tratados con estas enzimas (Cabaroglu et al., 2003). Este aumento depende de la cantidad de precursores glicosídicos que estén presentes en el jugo, y como la concentración de estos precursores es muy variable entre ellos, algunos monoterpenos van a incrementarse más que otros. Estudios realizados sobre la hidrólisis enzimática de glicósidos obtenidos a partir de las

variedades de uvas Moscatel, Riesling, Semillon, Chardonnay, Sauvignon y Sirah, han demostrado no sólo la liberación de terpenos sino también la liberación de C13 norisoprenoides. Estos compuestos se encuentran glicosilados en la uva, no encontrándose en forma libre y luego de su hidrólisis pueden conferir cierta tipicidad aromática al vino, contribuyendo así con el aroma característico de la variedad.

### **1.3. Carotenoides y derivados C13 norisoprenoides**

Los carotenoides son pigmentos presentes en las uvas maduras, que tienen el mismo origen biosintético que los terpenos pero con un grado de polimerización más elevado (40 carbonos) (Spurgeon y Porter, 1980).

Por degradación foto-química o enzimática los carotenoides dan origen a compuestos aromáticos de 9, 10, 11 o 13 átomos de carbono (norisoprenoides), más solubles, más volátiles y más olorosos, que son frecuentemente responsables de notas aromáticas propias (Enzell, 1981; Enzel, 1985; Schreier, 1984). La mayor parte de estos compuestos se encuentran en estado de trazas o no existen en su forma libre en la uva. Por el contrario, los mismos son relativamente abundantes como precursores en sus formas glicosiladas (Williams et al., 1992).

El  $\beta$ -caroteno es un hidrocarburo; todos los demás carotenoides se encuentran di- o tri-oxigenados (Baumes et al., 2002).

Los norisoprenoides más abundantes en uvas son 3-oxo- $\alpha$ -ionol, 3-hidroxi- $\beta$ -damascona y el vomifoliol. Estos compuestos se encuentran en forma glicosilada en uvas y su hidrólisis y posterior rearreglo molecular, es el mecanismo seguido en la formación de varios de estos norisoprenoides aromáticos en vinos (Sefton et al., 1993).

### **1.4. Percepción del aroma; el concepto de “flavor”**

El “flavor” es la respuesta integrada a la compleja mezcla de estímulos que un individuo percibe durante la ingesta de un alimento, y está determinado principalmente por los sentidos del gusto y el olfato. Los “sentidos del trigémino,” que detectan irritantes químicos en la boca y la garganta, ocasionalmente también podrán determinar el sabor (Fisher y Scott, 2000). Tanto el gusto como las sensaciones trigeminales son consecuencia de interacciones con moléculas polares, solubles en agua, y no volátiles. Los compuestos volátiles se unen a los receptores olfativos. La interacción puede ser vía nasal directa (olor) o retronasal, desde la boca (aroma), desencadenando las sensaciones olorosas.

El olfato es el más sensible de los cinco sentidos, pudiendo superar algunas veces incluso a los actuales instrumentos analíticos. Puede detectar compuestos volátiles a una concentración del orden de partes por trillón (Baldwin et al., 2000; Fisher y Scott, 2000).

El potencial aromático, o actividad olfativa de un compuesto particular, depende de tres factores: el descriptor, el umbral de percepción y la intensidad (función de la concentración).

La función que mejor representa la relación existente entre la concentración y la intensidad percibida es de forma sigmoideal (Delahunty et al., 2006). La respuesta se acelera al superar el umbral de percepción pero al final la respuesta alcanza una meseta donde la capacidad de percibir cambios en la concentración de los compuestos por los jueces disminuye, ya que en este punto el detector humano se encuentra saturado. En este modelo el primer punto de inflexión puede considerarse como la definición empírica del umbral de detección (Lawless et al., 1998; Marin et al., 1991).

La percepción de cualquier estímulo se debe al tratamiento de la información recibida por los órganos sensoriales, también denominados órganos receptores periféricos (boca, nariz, ojos, oídos). Estos receptores codifican la información en función de la intensidad y la calidad del estímulo. La información sensorial no nos llega tal cual, sino que en nuestro cerebro se ve sometida a un proceso de filtración, reducción y estabilización. Cuando la información llega a los centros superiores se integra en nuestro “sistema” y se origina un mensaje global-

sensorial y hedónico-íntimamente unido, lo que dificulta que el individuo sea capaz de separar entre los aspectos meramente sensitivos y los afectivos. De forma general, cuando expresamos espontáneamente lo que sentimos, se evoca primero la nota hedónica (placer experimentado por el individuo), después la cualidad percibida (por ej, aroma frutal) que es lo que conocemos como descriptor y por último la intensidad (baja, media o muy intensa) (Lawless et al., 1998).

El umbral de percepción de un compuesto aromático es la mínima concentración en la cual, el 50% de los degustadores reconocen la presencia de una sustancia aromática. Dicho umbral presenta una variabilidad en varios órdenes de magnitud entre diferentes compuestos. Por lo tanto, en un producto formado por diferentes compuestos volátiles, sólo una porción de estos superan el umbral de percepción y hacen una contribución directa al aroma y la intensidad de percepción se incrementa con el incremento de la concentración de un compuesto. Un compuesto puede tener una alta concentración pero si su umbral es grande (es decir, una alta concentración de este compuesto es necesario para percibirlo) no contribuirá significativamente al aroma. Por el contrario, un compuesto con un umbral bajo y una gran concentración probablemente dominará el aroma.

La forma de cuantificar un aroma es a través del llamado valor de aroma. Éste se define como: “la relación entre la concentración de la sustancia (C) y su umbral de detección (A)”, y se expresa en unidades de aroma (VAO: valores activos olfatorios = C/A).

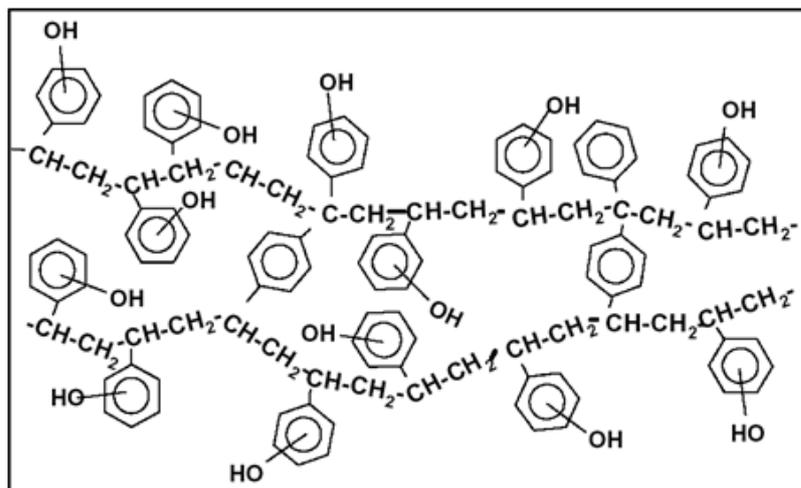
### **1.5. Cuantificación de los compuestos aromáticos libres y ligados**

Se han desarrollado diversos métodos con el objetivo de obtener un extracto que contenga todos los compuestos volátiles del vino original, sin alteración, degradación, o generación de artefactos. La extracción en fase sólida, a diferencia de las técnicas tradicionales como la extracción líquido-líquido, es la técnica más eficaz disponible para la preparación rápida y selectiva de muestras. Desde ya hace algunos años, se ha difundido el aislamiento de los glicósidos de vinos y jugos por retención selectiva de compuestos a través de la técnica de

adsorción en fase sólida sobre resinas, ya sea del tipo poliestirénico como la resina XAD-2 (Gunata et al., 1985), o del tipo C18 empacados en columna o como cartucho tipo Sep-Pak (Williams et al., 1982). Existe una gran diversidad de fases de adsorción disponibles comercialmente como son las resinas Amberlite XAD, soportes de base sílica con C8 y C18, y resinas del tipo Isolute ENV+ de naturaleza estireno divinil benceno.

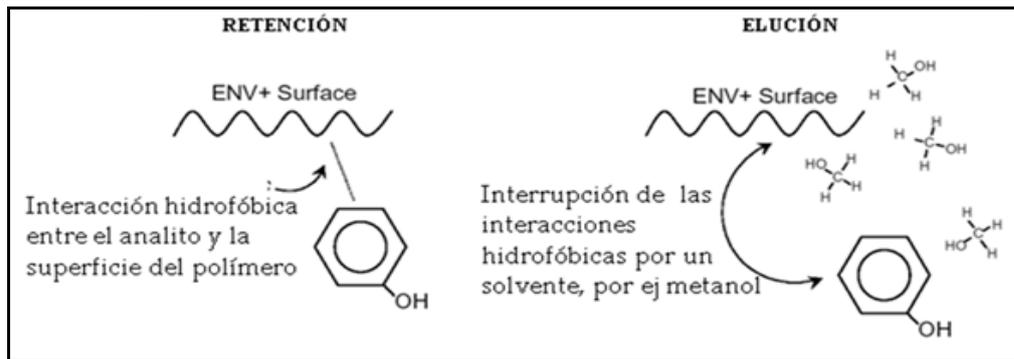
### Extracción con cartucho ISOLUTE ENV+

Es una resina polimérica del tipo estireno divinil benceno que se presenta en forma de cartuchos. Consiste de un medio adsorbente muy hidrofóbico especialmente derivatizado con la presencia de grupos fenoles. Esto determina que se disponga de una superficie fácilmente hidrofílica, eliminando la necesidad del acondicionamiento previo al uso con soluciones acuosas, y presentando una gran capacidad de adsorción (Figura 5). El mecanismo de retención es a través de interacciones no-covalentes (de tipo hidrofóbico) entre la molécula retenida y la superficie de la resina. Durante el proceso de elución el solvente, por ejemplo metanol, interrumpe estas interacciones hidrofóbicas con la superficie y permite la elución del analito (Figura 6).



Adaptado de International Sorbent Technology (2001) por (Boido, 2002).

Figura 5. Estructura química del ISOLUTE ENV+; polímero de poliestireno derivatizado.



Adaptado de International Sorbent Technology (2001) por (Boido, 2002).

Figura 6. Esquema de los mecanismos de retención y elución en el cartucho ISOLUTE ENV+.

### Índice Glicosil-Glucosa (G-G)

La cuantificación de los precursores glicosilados es de particular interés para la industria enológica, ya que los mismos son vistos como un parámetro de calidad en variedades de uva blanca que se utilizan para vinos frutados jóvenes. También interesa cuantificarlos cuando se utilizan tratamientos la enzima comercial, con el fin de establecer la dosis correcta de cada producto.

Los métodos utilizados para el análisis de glicósidos generalmente implican procedimientos complejos que combinan la extracción y la detección por cromatografía (Voirin et al., 1992a; Voiri et al., 1992b).

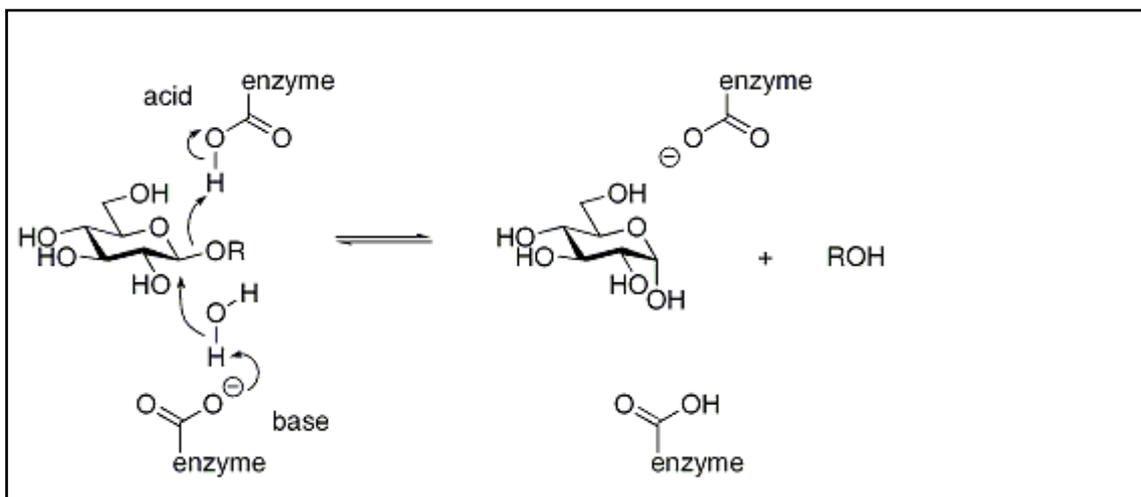
Una estrategia simple para medir la concentración de estos compuestos glicosilados en una muestra, sería la cuantificación del contenido de azúcar de los glicósido. Basándose en esto, Williams y colaboradores, en 1995 desarrollaron un método muy sencillo para la extracción y determinación total de metabolitos secundarios glicosilados (siendo algunos precursores aromáticos) en uvas, jugos y vinos. La hidrólisis posterior de los compuestos glicosilados produce concentraciones equimolares de D-glucosa, cuya cuantificación permite determinar el índice Glicosil-Glucosa (índice G-G).

Por lo tanto, la determinación de la concentración de G-G permitirá una estimación de la concentración total de metabolitos secundarios glicosilados presentes en la muestra. El método demostró ser simple, rápido y preciso (Abbott et al., 1993) implicando los siguientes pasos generales: (a) el aislamiento de la fracción

glicosídica de la muestra (jugo o vino) por retención selectiva de glicósidos en cartuchos de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> RP; (b) la hidrólisis con ácido sulfúrico de esta fracción glicosídica para liberar la glucosa; y (c) la medición de la concentración de la glucosa liberada mediante una determinación enzimática.

## 2. β-D-Glucosidasas

Las glicohidrolasas (clasificación E.C. 3.2.1.) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace entre un residuo glucídico terminal y una porción glucídica o no glucídica de un glicósido. La β-glucosidasa (β-D-glucósido-hidrolasa, E.C. 3.2.1.21) es la enzima que hidroliza la unión entre una molécula de glucosa y el sustituyente sobre el carbono anomérico. En la figura 7 se muestra el mecanismo general de la hidrólisis de glucósidos catalizada por β- glucosidasas.



**Figura 7. Mecanismo general de hidrólisis de glucósidos (β-glucosa-R) donde R es una aglicona como por ej: geraniol.**

Debido a que la hidrólisis de glicósidos es una vía esencial de muchos procesos metabólicos, las β-glucosidasas se encuentran en un gran número de organismos. En hongos y bacterias, las β-glucosidasas están involucradas en el catabolismo de la celulosa y celobiosa, formando parte del complejo celulasa. En insectos y plantas, esta enzima está implicada en el mecanismo de defensa mediante la liberación de cianuros a partir de precursores ciano-glicosídicos

(Bhatia et al., 2002). Adicionalmente, la función de las  $\beta$ -glucosidasas en plantas incluye la hidrólisis de precursores de fitohormonas, metabolismo de pigmentos, germinación de semillas y conversión de biomasa. En humanos, están implicadas en la enfermedad de Gaucher (Llorca y Noguera, 2002). Dependiendo de su origen, las  $\beta$ -glucosidasas presentan diferentes características fisicoquímicas, y sólo se discutirán a continuación aquellas propiedades que conciernen a la producción de vinos.

## **2.1. El origen y las propiedades de las $\beta$ -glucosidasas implicadas en enología son múltiples.**

Con relación a la industria del vino, se han reportado  $\beta$ -glucosidasas en *Vitis vinífera*, en bacterias del género *Oenococcus*, en levaduras del género *Saccharomyces*, *Candida*, *Aspergillus*, *Hanseniaspora*, entre otras.

### **$\beta$ -Glucosidasas de plantas**

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en uvas *V. vinífera* y su participación en los procesos enológicos está estrechamente relacionada con los diferentes compuestos presentes y los organismos que entran en juego durante la vinificación.

La existencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en uvas fue sugerida por Cordonnier y Bayonove, en 1974. Posteriormente, los estudios de extractos enzimáticos en uvas, indicaron la presencia de actividades  $\beta$ -glucosidasa, arabinosidasa y ramnosidasa en granos de uvas de diversas variedades, siendo la actividad  $\beta$ -glucosidásica la mayoritaria y la actividad de la enzima  $\beta$ -apiosidasa no confirmada en esta fruta (Aryan et al., 1987; Gunata et al., 1990a). La actividad  $\beta$ -glucosidasa ha sido encontrada en variedades de uvas aromáticas y no aromáticas y se ha observado que la misma aumenta con la madurez de la fruta.

En general, se ha visto que las  $\beta$ -glucosidasas de origen vegetal (endógenas) son capaces de hidrolizar los monoglucósidos terpénicos con un grupo alcohol primario (geraniol, nerol, citronerol) pero presentan baja actividad sobre los monoglucósidos terpénicos con un grupo alcohol terciario (linalol,  $\alpha$ -

terpineol). Esta especificidad de las  $\beta$ -glucosidasas derivadas de la uva hacia las agliconas, junto a la baja estabilidad reportada frente al pH del vino y la inhibición a concentraciones de glucosa superiores al 1%, limitan ampliamente la utilidad de estas enzimas para hidrolizar los glicósidos monoterpénicos en el vino (Bayonove et al., 1984; Aryan et al., 1987).

Por lo tanto, estas características restringen las aplicaciones de las  $\beta$ -glucosidasas endógenas (nativas de *V. vinifera*) ya que la mayoría de los glicósidos presentes en los jugos de uva o fruta no son hidrolizados y permanecen como fuente no-utilizada de aroma potencial (Cordonnier et al., 1986; Gunata et al., 1990a; Dubourdieu et al., 1988; Aryan et al., 1987; Palmeri y Spagna, 2007; Pogorzelski y Wilkowska, 2007).

Consecuentemente, se ha sugerido el uso de  $\beta$ -glucosidasas exógenas para el enriquecimiento del aroma en vinos y jugos de fruta (Matsui, et al., 2000; Aryan et al., 1987; Riccio et al., 1999; Gueguen et al., 1995). El vino obtenido con estas enzimas en el proceso de vinificación resulta ser más complejo y con aroma más intenso debido al aumento en la concentración de monoterpénos y norisoprenoides de trece carbonos (Gunata et al., 1993; Vasserot et al., 1995). Algunas de estas enzimas de origen exógeno, extraídas inicialmente de vegetales y más tarde de microorganismos, principalmente de hongos filamentosos y levaduras, demostraron poseer propiedades interesantes en la aplicación práctica (Grossmann et al., 1987; Gunata et al., 1985; Aryan et al., 1987; Rosi et al., 1994). La adición de  $\beta$ -glucosidasas de origen exógeno, durante o al final del proceso de fermentación constituiría la forma más efectiva de favorecer la hidrólisis de los precursores aromáticos para de esta forma enriquecer el aroma del vino. Sin embargo se requiere que estas enzimas sean activas y estables en las condiciones del vino, valores de pH ácido (entre 3 y 4) y en presencia de concentraciones relativamente altas de etanol (alrededor de 12%) y de glucosa (5 g/L).

Por lo tanto, con respecto a la explotación de las  $\beta$ -glucosidasas exógenas, se deben considerar tres importantes propiedades: (i) especificidad, (ii) pH óptimo, y (iii) tolerancia al etanol y a la glucosa.

### **$\beta$ -Glucosidasas microbianas**

Son muchos los microorganismos que pueden producir  $\beta$ -glucosidasas de utilidad para liberar compuestos aromáticos ligados. Se han reportado  $\beta$ -glucosidasas de importancia enológica en bacterias y hongos filamentosos, así como en diversas especies de levaduras (*Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*).

### **$\beta$ -Glucosidasas bacterianas**

Con respecto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa en bacterias, *Oenococcus oeni*, involucrada en la fermentación maloláctica, posee actividad  $\beta$ -glucosidasa y es capaz de hidrolizar precursores aromáticos a lo largo de la fermentación, beneficiando así el aroma final del vino (Boido et al., 2002; Barbagallo et al., 2004; Grimaldi et al., 2000).

### **$\beta$ -Glucosidasas en hongos filamentosos**

Las glicosidasas de *Aspergillus niger* han sido muy utilizadas para estudiar la capacidad de hidrólisis de diversos glicósidos. Estas preparaciones comerciales, que pueden contener (de acuerdo a la preparación) distintas actividades enzimáticas, no sólo  $\beta$ -glucosidasa, arabinosidasa, y ramnosidasa, sino otras actividades adicionales no específicas, pueden ocasionar transformaciones indeseables de las agliconas libres, produciendo compuestos aromáticos no deseados con aromas desagradables (Sefton y Williams, 1991; Nicolini et al., 1994). Se han realizado esfuerzos sustanciales para obtener nuevas preparaciones que no tengan efectos colaterales o impredecibles en el vino. Estos esfuerzos se han focalizado en la purificación y caracterización de nuevas enzimas con actividades específicas de preparaciones fúngicas, resultando en procesos de purificación generalmente muy costosos. Una desventaja de estas enzimas purificadas es que poseen baja estabilidad y por lo tanto su estabilidad debe ser incrementada, por ejemplo, adoptando técnicas de inmovilización o modificación química (Aryan et al., 1987; Spagna et al., 1998). Otra limitante de las  $\beta$ -glucosidasas producidas por hongos filamentosos que restringe bastante su aplicación enológica, es su inhibición a concentraciones de glucosa superiores al 1-1,5% (Cordonnier et al.,

1989) y su baja tolerancia al pH del vino. Las mismas presentan un pH óptimo entre 4.5-5.0 y una temperatura óptima de 62-70°C.

Otros hongos filamentosos, como *Botrytis cinera* han demostrado ser buenos productores de  $\beta$ -glucosidasas, pero la mayoría presentan una actividad óptima a pH 6,5-7 y 50°C, por lo que no se ajustan a las condiciones de elaboración de vinos.

Es por esto que el uso de levaduras productoras de  $\beta$ -glucosidasas funcionales capaces de liberar monoterpenos a partir de sus precursores glicosilados es más interesante y menos problemático que el agregado de preparaciones de enzimas comerciales (Spagna et al., 1998).

### **$\beta$ -Glucosidasas de levadura**

La actividad  $\beta$ -glucosidasa es frecuentemente producida por levaduras aisladas de uvas y mostos, pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Metschnikowia*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* (Leclerc et al., 1984; Gondè et al., 1985; Gunata et al., 1990b; Rosi et al., 1994; Fernández et al., 2000). En la literatura existe poca información acerca de la actividad  $\beta$ -glucosidasa relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* y la misma es contradictoria. Algunos estudios destacan que las enzimas de *Saccharomyces cerevisiae* presentan muy baja actividad  $\beta$ -glucosidasa y que la misma es severamente inhibida a pH ácido y por glucosa y etanol en las concentraciones presentes durante la elaboración de los vinos (Rosi et al., 1994; Gunata et al., 1986; Fernandez et al., 2003). Sin embargo, otros autores aislaron cepas enológicas que presentaban actividad  $\beta$ -glucosidasa durante la fermentación del mosto (Delcroix et al., 1994; Spagna et al., 2002; Hernández et al., 2003).

Se ha investigado el efecto de  $\beta$ -glucosidasas aisladas de diversas especies no-*Saccharomyces* en la hidrólisis de los glicósidos terpénicos de uvas. Grossman y colaboradores en 1987, estudiaron las  $\beta$ -glucosidasas de las especies *Hansenula* presentes en mosto y encontraron que aunque esta enzima libera sustancias aromáticas en vino, parece ser menos eficaz en mosto. De acuerdo con esto, Dubordieu et al., (1988), observaron que la liberación de terpenos durante la

fermentación está directamente relacionada con la actividad  $\beta$ -glucosidasa presente en las levaduras. Estudios complementarios demostraron la presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en cepas de *Hanseniaspora vineae* y diversas especies de *Candida* (Vasserot et al., 1989; Gunata et al., 1990b). En un trabajo más extenso con 317 cepas correspondientes a 20 especies de levaduras vínicas, se observó que las levaduras de los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* presentaban actividad  $\beta$ -glucosidasa (Rosii et al., 1994). Posteriormente, los estudios de Saha y Bothast (1996), con 48 cepas de levadura de los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* y *Pichia* demostraron que si bien todas producen actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular, solamente 15 levaduras presentaban  $\beta$ -glucosidasas tolerantes a la glucosa (Esteve-Zarzoso et al., 1998).

Los mejores resultados de aplicación enológica se obtuvieron con cepas de *Debaryomyces* y *Candida* (Gueguen y Chemardin, 1996; Rosi et al., 1994; Yanai y Sato, 1999). Por ejemplo, el tratamiento del jugo de uva de moscatel con  $\beta$ -glucosidasa de *Debaromyces vanriji*, permitió incrementar el aroma del mismo. Asimismo, la actividad  $\beta$ -glucosidasa en *Candida molischiana* y *Candida wickerhamii*, es poco influenciada por el medio (Gonde et al., 1985; Leclerc et al., 1984). La cepa *Candida molischiana* 35M5N aislada por Janbon et al. (1995) produce grandes cantidades de  $\beta$ -glucosidasa con una actividad óptima a pH 3,5 y además su actividad se ve favorecida por el etanol del medio. Sin embargo, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de cepas no-*Saccharomyces* no son activas a bajos valores de pH, como es el caso de *M. pulcherrima* (González-Pombo et al., 2008), *H. uvarum* (Barbagallo et al., 2004), *Z. Baili* (Gueguen et al., 2008), and *P. pastoris* (Turan et al., 2005) y existe muy poca información acerca de la estabilidad de las mismas (Belancic et al., 2003).

Más allá de evaluar el efecto en el contenido aromático de un vino resultante (obtenido por tratamiento enzimático), es difícil hacer una comparación directa de los datos publicados sobre las propiedades de las  $\beta$ -glucosidasas, ya que están implicadas diferentes preparaciones enzimáticas, variedades de fruto, métodos de extracción y técnicas analíticas.

En cuanto a la biosíntesis de la enzima, se observó que la misma ocurre durante la etapa de crecimiento exponencial de la levadura (Delcroix et al., 1994; Rosi et al., 1994). Estas enzimas tienen por lo general un máximo de actividad alrededor de pH 5.0 y una temperatura óptima en torno a los 40-50°C.

### **Las $\beta$ -glucosidasas de cepas no-*Saccharomyces* tienen alto potencial para desarrollar la tipicidad del vino.**

Existe una fuerte evidencia que, en contraste con la mayoría de las especies *Saccharomyces*, muchas levaduras no-*Saccharomyces* producen glucosidasas intra y extracelulares (Jolly et al., 2006). Numerosos reportes indican que las  $\beta$ -glucosidasas de levaduras nativas no-*Saccharomyces* tienen un efecto significativo en el desarrollo del aroma de los vinos (Jolly et al., 2006; Swiegers et al., 2005). Por lo tanto, el rol de estas levaduras en la fermentación del vino está recibiendo cada vez más atención y este trabajo de tesis apunta a aportar información al respecto.

Históricamente se pensaba que durante el proceso fermentativo del vino, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* era la que presentaba responsabilidad exclusiva. Hace ya algunos años que los enólogos, especialmente en los países del viejo mundo, descubrieron a las levaduras nativas como parte integrante de la autenticidad de sus vinos, ya que éstas le impartían características regionales y otras características deseables a los mismos (Amerine et al., 1972; Jackson, 1994). Numerosos estudios apoyan este punto de vista (Fleet, 1990; Heard, 1999) por lo que se trata de un tema de gran interés actual para los microbiólogos de la industria enológica en todos los países productores de vinos (Jolly et al., 2006).

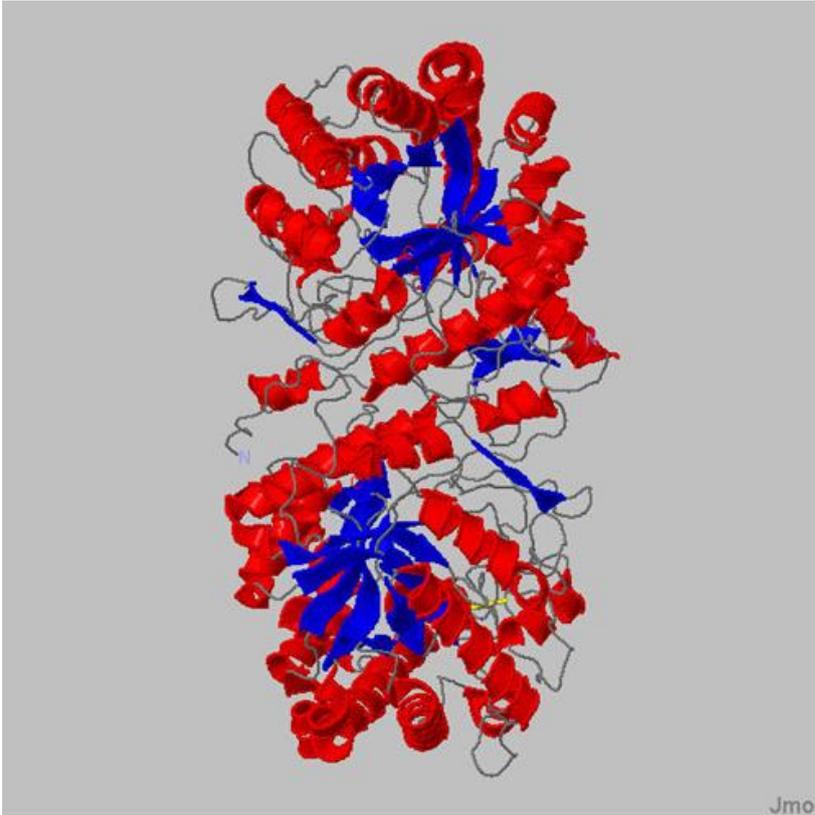
Actualmente se sabe que la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para el desarrollo de las características aromáticas de los vinos es muy limitada, ya que esta levadura por sí sola no es capaz de mejorar el perfil terpénico de los mismos (Carrau et al., 2005). Por otra parte, los aislamientos de las cepas no-*Saccharomyces* productoras de actividades  $\beta$ -glucosidasa, en conjunto con *S. cerevisiae* tienen alto potencial para aportar aromas y sabores típicos de cada zona vitivinícola.

Actualmente, el deseo de conseguir vinos de calidad uniforme y adecuada, han hecho que el proceso de vinificación se lleve a cabo con levaduras seleccionadas, aquellas que forman parte del ecosistema del vino y adaptadas al ambiente enológico. El conocimiento de nuevas enzimas provenientes de levaduras no-*Saccharomyces* puede tener gran impacto y aplicación para mejorar las características sensoriales de los vinos (Egli et al., 1998; Henick-Kling et al., 1998; Soden et al., 2000).

## 2.2. Estructura de las glicosidasas

Estas enzimas son miembros de las familias 1 y 3 de la superfamilia de las glicosil-hidrolasas, de las que se han descrito 81 familias en base a la similitud de secuencias de aminoácidos. Además de las  $\beta$ -glucosidasas, las familias 1 y 3 incluyen otras glicosil hidrolasas de diferentes actividades enzimáticas.

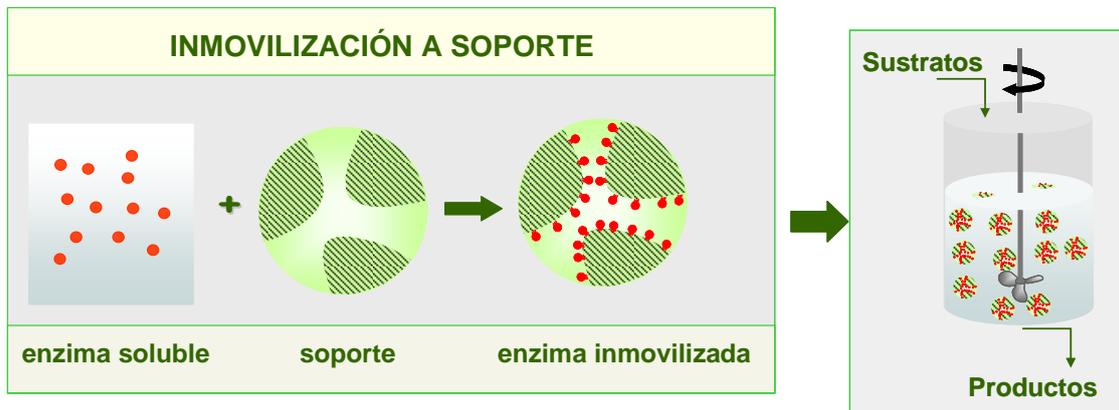
Existen pocas estructuras disponibles para estas familias, sin embargo se ha sugerido que pertenecen a una superfamilia de barriles  $(\alpha/\beta)_8$  con similares residuos de aminoácido en sus sitios activos. El nucleófilo del sitio activo es un glutamato, que se encuentra cerca del carboxilo terminal de la hebra beta siete y tiene además la secuencia asparagina-glutamato. Un ejemplo de estas estructuras se muestra en la Figura 8, donde se observa el barril  $(\alpha/\beta)_8$  en dos proyecciones diferentes.



**Figura 8.** Estructura de la  $\beta$ -glucosidasa cianogénica de trébol blanco (ID del Protein Data Bank: 1CBG)

### 3. Inmovilización de enzimas

El término enzimas inmovilizadas hace referencia a aquellas enzimas que están físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida del espacio con retención de sus actividades catalíticas y las cuales pueden ser usadas de forma continua y repetida (Katchalski-Katzir, 1993). Por lo tanto la inmovilización implica la unión de la enzima a un soporte sólido o la unión de una molécula de proteína con otra (entrecruzamiento). Alternativamente, el biocatalizador puede ser confinado en un área restringida, de la que no puede salir pero en la que permanece catalíticamente activo (confinamiento en una matriz sólida o compartimientos restringidos por membranas) (Martinek et al., 1985). Lo común en todos los casos mencionados, es que la enzima pasa de ser un catalizador homogéneo (enzima soluble) a ser un catalizador heterogéneo (enzima insoluble) (Figura 8).



**Figura 8. Inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos**

Esto permite la reutilización del catalizador enzimático, facilita la separación y extracción de sustratos y productos del medio de reacción, y así tener un control más preciso del curso de la reacción y por último puede llegar a estabilizar la estructura de la enzima frente a diferentes condiciones de reacción (Weetall, 1980; Klivanov, 1983; Monsan et al., 1988; Illanes, 1994).

En la Tabla 1 se describen las ventajas y desventajas de la utilización de la inmovilización de enzimas (Illanes, 1994; Guisan, 2006; Brena y Batista, 2006).

**Tabla 1. Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos. (Illanes 1994)**

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo de sistemas continuos</li> <li>• Mayor estabilidad</li> <li>• Uso más eficiente del catalizador</li> <li>• Facilidad de control y automatización</li> <li>• Flexibilidad en diseños de reactores</li> <li>• Efluentes libres de catalizador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costo adicional de soportes y reactivos de inmovilización</li> <li>• Coste adicional de la operación de inmovilización</li> <li>• Pérdidas de actividad enzimática durante la inmovilización</li> <li>• Posibles requerimientos adicionales de purificación</li> <li>• Restricciones difusionales e impedimentos estéricos</li> <li>• Requerimiento de sustratos solubles y peso molecular no elevado</li> </ul>

En las últimas décadas la inmovilización de proteínas en fase sólida se ha incorporado como herramienta en variados procesos biotecnológicos, los que serían difíciles o incluso imposibles de realizar con enzimas o proteínas en

solución (Taylor, 1991). Los principales componentes para el diseño de un nuevo derivado inmovilizado son: la proteína, el soporte (matriz, fase sólida), y el modo de unión proteína-soporte.

### **Las propiedades de la matriz o soporte determinan el comportamiento del sistema.**

En este sentido, un soporte ideal debería poseer las siguientes propiedades: resistencia física a la compresión, hidrofiliidad, fácil derivatización, biocompatibilidad, inercia hacia la acción de las enzimas, resistencia al ataque microbiano, y accesibilidad a bajo costo.

El carácter hidrofílico de la matriz es uno de los factores más importantes que determinan la actividad de una enzima inmovilizada (Gemeiner, 1992). Una excelente matriz que ha sido utilizada extensamente es la agarosa, la cual debido a su alta porosidad, presenta una gran capacidad para la unión de proteínas. Algunas otras ventajas de la agarosa como soporte son: su carácter hidrofílico, su fácil derivatización, la ausencia de grupos cargados lo cual evita la adsorción no-específica de sustratos y productos, y su accesibilidad comercial. Sin embargo, el uso de la agarosa y otros soportes porosos a nivel industrial está limitado por su alto costo. Este problema puede ser superado utilizando métodos reversibles de inmovilización, que permiten la regeneración y re-uso de la matriz (Brena, 1996). Por otra parte, su falta de rigidez limita la aplicación industrial de la agarosa en gran escala. En estos casos son necesarios soportes más rígidos, biocompatibles y más baratos. Más recientemente se han incorporado para la inmovilización de enzimas de uso industrial, las resinas acrílicas epoxi-activadas basadas en perlitas macro-porosas sintéticas (Katchalski-Katzir, 2000; Mateo, 2002). Actualmente existen muchos soportes para inmovilización disponibles comercialmente, la mejor elección en cada caso requiere la consideración de algunas propiedades relevantes de la enzima y el uso al que está destinado.

### **La unión proteína-soporte puede basarse en interacciones reversibles o irreversibles.**

Las proteínas pueden unirse al soporte por interacciones que van desde adsorción física reversible y uniones iónicas hasta enlaces covalentes estables. Una forma de clasificar los diversos métodos de inmovilizar proteínas es en dos grandes categorías: métodos reversibles o irreversibles (Gupta, 1992). La fuerza de la unión proteína-soporte usualmente está relacionada de manera inversa a la facilidad con la cual puede ser revertida. Estos dos objetivos conflictivos, la estabilidad de la unión y su reversibilidad, son muy difíciles de satisfacer simultáneamente. El enfoque tradicional ha sido formar un enlace proteína-soporte tan fuerte como sea posible, sacrificando entonces la reversibilidad del mismo. El concepto de inmovilización irreversible de enzimas significa que una vez que el biocatalizador es unido al soporte, no puede ser removido sin destruir ya sea su actividad biológica o el soporte.

El uso de métodos reversibles para la inmovilización de enzimas es altamente atractivo, principalmente debido a razones económicas. En particular, si se trabaja con enzimas lábiles o en aplicaciones de sistemas bio-analíticos, el costo del soporte es un factor primario en el costo global del biocatalizador inmovilizado por lo que la inmovilización reversible de enzimas es particularmente interesante, simplemente porque cuando la actividad enzimática del derivado decae, el soporte puede ser regenerado y cargado de nuevo con enzima fresca (Gupta, 1992). Uno de los métodos de inmovilización reversible más ampliamente utilizado a nivel industrial se basa en el uso de intercambiadores iónicos (Taylor, 1991). Se ha reportado también el uso de interacciones con quelatos metálicos y fenilboronatos como ligandos, entre otros (Brena, 1996).

La inmovilización de enzimas por unión covalente a un soporte es uno de los métodos de inmovilización irreversibles más ampliamente utilizados. Una ventaja de estos métodos es que debido a la naturaleza estable de los enlaces formados entre la enzima y la matriz, no hay riesgo de que el biocatalizador sea liberado a la solución durante su uso. Se ha desarrollado una variedad muy amplia de reacciones de acoplamiento proteína-matriz, dependiendo de los grupos funcionales disponibles (Scouten, 1987). Las reacciones más frecuentemente usadas involucran cadenas laterales de los siguientes aminoácidos de las proteínas: lisina (grupo  $\epsilon$ -amino), cisteína (grupo tiol), ácidos aspártico y glutámico (grupos carboxilo). En

relación a la química de inmovilización, es importante el desarrollo de métodos que permitan que las reacciones transcurran eficientemente bajo condiciones suaves, de forma que se mantenga la actividad de la enzima nativa y se alcancen altos rendimientos. Para ello es necesario intentar más de un enfoque y adaptar el método a las circunstancias específicas (White, 1980; Taylor, 1991).

En este trabajo de tesis se han utilizado tanto procedimientos reversibles de inmovilización (basados en interacciones iónicas) como irreversibles (interacciones covalentes).

### Inmovilización covalente en matrices epoxi- activadas.

Más recientemente se han incorporado para la inmovilización de enzimas de uso industrial, las resinas acrílicas comerciales epoxi-activadas (Eupergit C) basadas en perlitas macroporosas (Katchalski-Katzir, 2000; Mateo, 2002) con un diámetro de 100–250  $\mu\text{m}$ . El Eupergit C es sintetizado por la copolimerización de N, N -metileno-bis-(metacrilamida), glicidilmetacrilato, alilglicidil éter y metacrilamida (Figura 9).

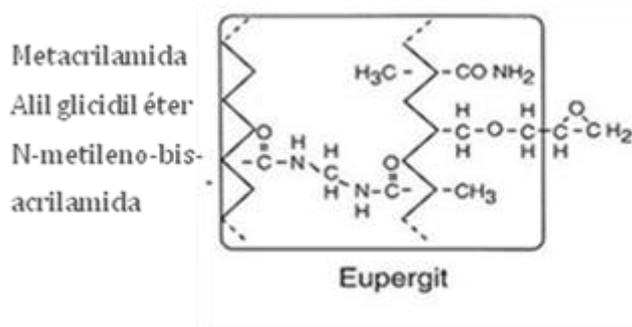
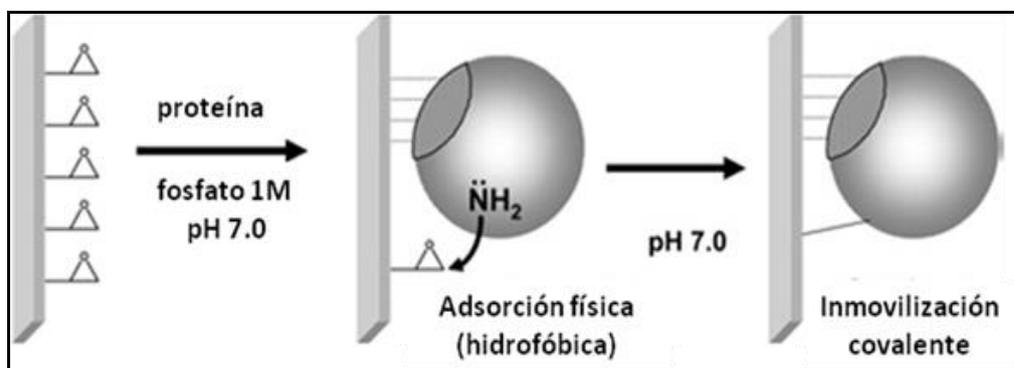


Figura 9. Estructura de Eupergit C.

Se ha propuesto un mecanismo de unión en dos etapas para este proceso (Figura 10) (Mateo et al., 2007). Se supone que, en el primer paso, la enzima es físicamente adsorbida al soporte por interacciones hidrofóbicas. Esto lleva a la proximidad de los grupos amino y tiol en la superficie de la enzima hacia los grupos oxirano del soporte. En la segunda etapa, estos grupos de la proteína reaccionan con los grupos oxirano por ataque nucleofílico. De esta manera, se

forman enlaces C-N y C-S muy estables, con ausencia de liberación de proteína del soporte (Boller et al., 2002). La alta densidad de grupos oxirano en la superficie del soporte (600  $\mu\text{moles/g}$  Eupergit C seco), promueve la unión "multipuntual" enzima-soporte. Se ha demostrado que dicha unión multipuntual conduce a un aumento en la estabilidad conformacional de la enzima y, por tanto, mejora la estabilidad operacional a largo plazo del biocatalizador. Debido a su compatibilidad con una amplia gama de enzimas diferentes, Eupergit C se utiliza con frecuencia para la inmovilización de enzimas en la investigación académica y a nivel industrial (Katchalski-Katzir, 2000; Calleri et al., 2004; Mateo et al., 2006).



**Figura 10. Inmovilización de proteínas sobre soportes acrílicos epoxi-activados. (Mateo et al., 2007)**

Dado que estas resinas son moderadamente hidrofóbicas, la inmovilización se debe realizar a muy alta fuerza iónica (ej. 1 M tampón fosfato de sodio).

**La inmovilización junto con las modificaciones del nanoambiente puede modificar y mejorar las propiedades de las proteínas.**

Como consecuencia del proceso de inmovilización, algunas propiedades de la enzima, tales como su actividad catalítica o su estabilidad, pueden resultar alteradas con respecto a su contraparte soluble (Hartmeier, 1988; Trevan, 1980; Klivanov, 1983). El proceso de inmovilización usualmente provoca una variedad de efectos en la conformación así como también en el estado de ionización y disociación de la enzima y su entorno, ocasionando por ejemplo cambios en su relación frente al pH, la estabilidad y la actividad (Messing, 1975).

Esta modificación en las propiedades puede ser causada tanto por cambios en la actividad intrínseca de la enzima inmovilizada, o por el hecho de que la interacción entre la enzima inmovilizada y el sustrato tiene lugar en un microambiente que es diferente a la solución. Los cambios observados en las propiedades catalíticas luego de la inmovilización pueden también deberse a cambios en la estructura tridimensional de la proteína provocados por su unión a la matriz. Los efectos negativos de la inmovilización sobre la actividad de la enzima nativa deben ser minimizados, desarrollando en cada caso una metodología de inmovilización adecuada a las características del sistema en estudio.

La estabilidad de una enzima inmovilizada está determinada por muchos factores tales como la naturaleza y el número de enlaces formados entre la enzima y la matriz, el grado de confinamiento de las moléculas de enzima en el soporte, el microambiente, las condiciones de inmovilización, entre otros (Cao, 2005).

Frecuentemente la inmovilización de una enzima de por sí no es suficiente como estrategia única para alcanzar un alto grado de estabilización, especialmente en presencia de condiciones adversas como ser pH, temperatura y solventes orgánicos. En medio acuoso las moléculas de enzima están rodeadas por una capa de hidratación formada por moléculas de agua unidas a su superficie por puentes de hidrógeno. Esta capa de hidratación o al menos parte de ella representa una parte integral de la proteína y es esencial para su estructura y función. El desplazamiento de estas moléculas tanto por solventes orgánicos como por el efecto del calor resulta en un cambio dramático en la estructura de la enzima provocando su desnaturalización. Esta tiene lugar luego de que cierta cantidad de agua de la capa de hidratación de la proteína es desplazada por acción del solvente orgánico. Cuando las enzimas son utilizadas como biocatalizadores, éstas deben ser estables en el medio seleccionado, de lo contrario las mismas deben ser estabilizadas por métodos apropiados para prevenir su inactivación. Se han diseñado estrategias complementarias a la inmovilización para modificar el entorno que rodea las moléculas del biocatalizador inmovilizado, de manera de protegerlo de los efectos agresivos del medio (Ogino et al, 2001). La mayoría de los esfuerzos de estabilización han involucrado el agregado de agentes químicos, modificación

química, inmovilización e ingeniería genética (Hari Krishna, 2002; Klibanov, 1983; Tyagi et al., 1999).

Por lo tanto, una vez optimizada la química de inmovilización y seleccionada una matriz adecuada, es importante investigar las modificaciones en el nano-ambiente como estrategia complementaria para mejorar las propiedades de la enzima en las condiciones del sustrato a biotransformar (Irazoqui et al., 2002, Fernandez-Lafuente, et al., 1999). En el caso de la inmovilización covalente, la alteración del nano-ambiente puede realizarse fácilmente por bloqueo de los grupos reactivos remanentes en la matriz que no reaccionaron con la enzima (Irazoqui et al., 2002). Los agentes bloqueantes utilizados pueden ser moléculas pequeñas (ej.: aminas, aminoácidos, mercaptanos), o macromoléculas (ej.: BSA, PEG, polietilenimina) que confieren propiedades especiales a ese nano-ambiente donde se encuentra la enzima. La introducción de macromoléculas hidrofílicas (ej.: dextranos modificados) en la proximidad de la enzima inmovilizada puede crear un microambiente hidrofílico estabilizante (Abian et al., 2001; Irazoqui et al., 2007) (Figura 11). La hidrofiliación del nano-ambiente también puede lograrse por la introducción de brazos espaciadores hidrofílicos (Cao, 2005).

Una estrategia posible es diseñar las características de carga del nano-ambiente para promover interacciones favorables entre la enzima y la matriz, con la finalidad de maximizar el mantenimiento de la conformación nativa de la enzima cuando es expuesta a condiciones desnaturalizantes (Irazoqui et al., 2002).

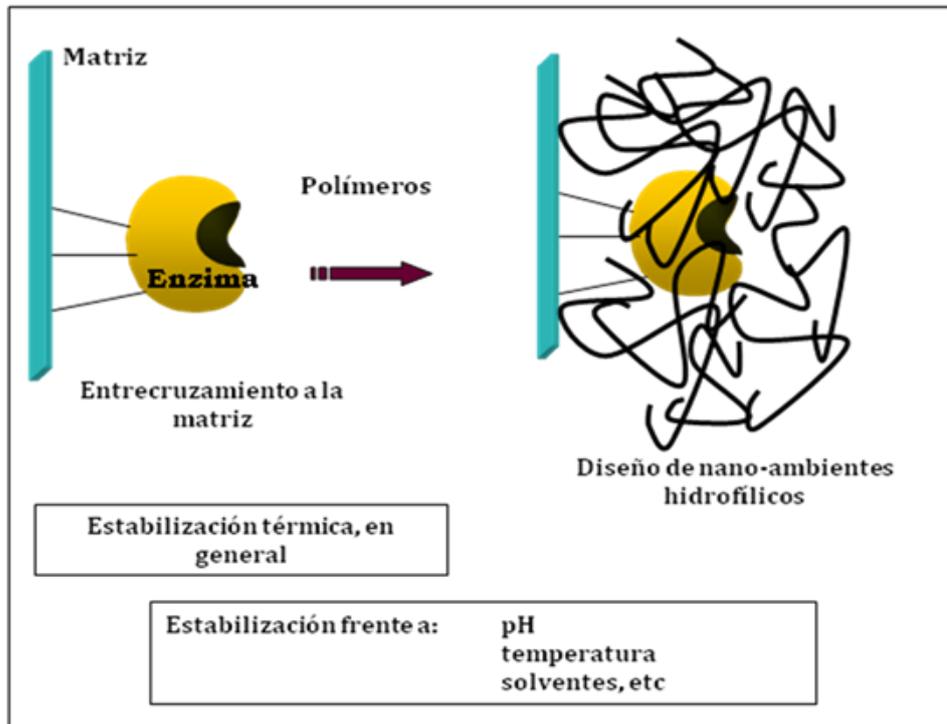


Figura 11. Efecto de las modificaciones en el nano-ambiente como estrategia de estabilización de enzimas.

### 3.1. Inmovilización de $\beta$ -glucosidasas

En los últimos años ha habido un trabajo considerable en el desarrollo de métodos de bajo costo para la inmovilización de  $\beta$ -glucosidasas. Hay varios reportes que han sido revisados por Palmeri et al., (2007) sobre la inmovilización de glicosidasas en matrices inorgánicas ( $\alpha$ - y  $\gamma$ -alúmina, bentonita) y en matrices orgánicas (Eupergit-C, Xad 7®, celulosa y celulosa funcionalizada, amino agarosa y geles de quitosano). Sin embargo la literatura relativa a la inmovilización de  $\beta$ -glucosidasas de levadura (Gueguen et al., 1997; Riccio et al., 1999) es escasa en comparación con las de preparaciones comerciales fúngicas (Palmeri et al., 2007; Shoseyov et al., 1990; Gueguen et al., 1997; Karagulyan et al., 2008; Erzhenget al., 2009). Preparaciones comerciales de  $\beta$ -glucosidasas de *A. niger* han sido inmovilizadas a escala piloto [Gallifuoco et al., 1998; Gallifuoco et al., 1999], encontrándose en el vino tratado con enzimas inmovilizadas una concentración de

agliconas mayor que en el vino sin tratar, presentando además, una mayor selectividad frente a alcoholes primarios que terciarios.

La utilización de  $\beta$ -glucosidasas en enología requiere del desarrollo de un biocatalizador inmovilizado de forma de controlar adecuadamente el grado de avance de la reacción de hidrólisis y así permitir una liberación rápida de terpenos, conservando una fracción de aromas ligados como reserva potencial para ser liberados con el tiempo.



## ***JUSTIFICACION Y OBJETIVOS***

---

El papel de las levaduras no-*Saccharomyces* en la fermentación del vino está recibiendo cada vez más atención y numerosos estudios indican que estas cepas tienen un efecto significativo en el desarrollo del aroma. Como se mencionó anteriormente, existe fuerte evidencia de que en contraste con la mayoría de las especies *Saccharomyces*, muchas levaduras de género no-*Saccharomyces* producen  $\beta$ -glucosidasas intra- y extracelulares.

Por otra parte, hace algunos años que se ha centrado la atención en el uso de glicosidasas exógenas, especialmente  $\beta$ -glucosidasas, de levaduras y hongos filamentosos para incrementar el aroma de los vinos. El aroma varietal y, por tanto, la calidad percibida se incrementan mediante la promoción de la hidrólisis de los terpenos glicosilados, por lo que las aplicaciones potenciales de las  $\beta$ -glucosidasas de las cepas no-*Saccharomyces* en la industria vitivinícola son interesantes.

Dado que el interés por el uso de  $\beta$ -glucosidasas de cepas nativas de levaduras es relativamente reciente, los antecedentes del estudio de sus propiedades y actividad sobre los precursores aromáticos son escasos, este constituye un campo de investigación con muchas posibilidades.

En el presente trabajo se abordan aspectos relacionados con el aislamiento y caracterización de  $\beta$ -glucosidasas de cepas de levaduras autóctonas aisladas de mostos y uvas provenientes de viñedos uruguayos, así como el estudio de su comportamiento en la liberación de aromas en un vino joven. Se pretende con este trabajo contribuir al mejor conocimiento del potencial existente en enzimas de la flora autóctona y generar las bases del estudio de la posible utilización enológica de las  $\beta$ - glucosidasas.

**Estas consideraciones nos llevan a plantear los siguientes objetivos en la presente Tesis Doctoral:**

- 1- Contribuir al conocimiento de las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucosa glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) de la flora autóctona mediante el aislamiento y caracterización de sus propiedades.
- 2- Desarrollo de un biocatalizador inmovilizado de  $\beta$ -glucosidasa, activo y estable, que permita un control optimizado del proceso de aromatización para mejorar el aroma de los vinos jóvenes.

**En el transcurso de este trabajo se han abordado los siguientes objetivos específicos:**

- Aislamiento y purificación de  $\beta$ -glucosidasas a partir de cepas de levaduras nativas no- *Saccharomyces*.
- Caracterización preliminar de las propiedades de las  $\beta$ -glucosidasas y selección de una enzima interesante para uso enológico.
- Desarrollo de diversas estrategias de inmovilización: inmovilización por adsorción iónica a geles amino-agarosa e inmovilización covalente sobre soportes epoxi-activados.
- Diseño de estrategias complementarias a la inmovilización para la estabilización de las  $\beta$ -glucosidasas: modificación del nano-ambiente mediante macromoléculas hidrofílicas.
- Obtención de un biocatalizador inmovilizado con propiedades adecuadas de actividad y estabilidad, para el estudio de liberación de aromas en vinos jóvenes.
- Estudios de liberación de aroma en vino Moscatel con el biocatalizador inmovilizado de  $\beta$ -glucosidasa. Evaluación del perfil aromático obtenido mediante la utilización de métodos químicos (GC-MS) y estudios sensoriales.

## ***MATERIALES***

---

Las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo fueron seleccionadas a partir de una colección de 60 cepas de levaduras nativas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, aisladas de uvas y mostos procedentes de viñedos uruguayos, suministradas por el grupo de Enología de Facultad de Química (Montevideo, Uruguay). Los sustratos *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (pNPR), *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosido (pNPA), 4-metil- $\beta$ -umbeliferil- $\beta$ -D-glucosido, D-(+) celobiosa y el reactivo de Folin & Ciocalteu fueron comprados a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU). La preparación enzimática Cytolase PCL5 fue suministrada por DSM Food Specialties (MA Delft, Netherlands). La esculina fue adquirida de ICN Biomedicals (Ohio, USA). El kit de desglicosilación (Glycofree TM Chemical Deglycosylation Kit) fue adquirido de Prozyme-GLYCO (San Leandro, USA). El kit enzimático para la determinación de glucosa fue comprado a REACUR (Montevideo, Uruguay). La Sepharose CL-4B y las columnas PD-10 para desalado (Sephadex G 25) fueron suministradas por General Electric Healthcare (GE Healthcare, UK). Los geles epoxi activados Eupergit C y Eupergit C 250L fueron suministrados generosamente por Rhom Pharma GmbH (Damerstadt, Alemania). El reactivo de Bradford fue suministrado por Bio-Rad laboratories (Richmond, CA). Los cartuchos de fase reversa C18 (Sep-Pak® cartridge) fueron comprados a Waters TM (USA) y los cartuchos ISOLUTE® ENV+ fueron adquiridos de IST Ltd, Mid Glamorgan (U.K). Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## ***MÉTODOS***

---

### **Screening de actividad $\beta$ -glucosidasa**

Se utilizó el medio Agar Esculina con glicerol a pH 4.0 y pH 5.5 (Eberhart et al., 1964) en donde fueron sembradas en forma radial mediante la realización de una estría de aproximadamente 1cm de largo por 0.5 cm de ancho, las cepas nativas de *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, junto con los correspondientes controles positivos y negativos. Las placas fueron incubadas a 25°C y examinadas durante 6 días de acuerdo con la técnica desarrollada por Perez et al (2010).

## Identificación

Las cepas de levadura no-*Saccharomyces* seleccionadas (**0023**: *M. pulcherrima*, **0621**: *I. terricola* y **0605**: *H. uvarum*) fueron identificadas utilizando criterios moleculares y fisiológicos.

## Condiciones de cultivo

El medio de cultivo para el crecimiento de las levaduras consistió en tampón fosfato-citrato pH 5.0 conteniendo: peptona 1 g/L, extracto de levadura 25 g/L y glicerol 8 mL/L. Se estudió la influencia de la celobiosa (0.5%) como inductor de la actividad enzimática. Los cultivos aeróbicos se incubaron a 28°C en matraces Erlenmeyer conteniendo 1/10 de su volumen en un agitador orbital (100 oscilaciones min<sup>-1</sup>). Se siguió el crecimiento durante 10 días por medida de absorbancia a 600 nm.

## Aislamiento de $\beta$ -glucosidasa

Cuando el origen de la enzima era extracelular, el cultivo se centrifugó a 5000xg durante 30 min a 4°C y se determinó la actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular en el sobrenadante. En el caso de la cepa *Issatchenkia terricola* el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio (70% de saturación) durante 24 horas. Luego se centrifugó y disolvió en tampón acetato de sodio 0.1 M a pH 4.5 y se dializó contra agua destilada (extracto enzimático).

Cuando la enzima era de origen intracelular, se realizó la rotura celular utilizando ultrasonido en baño de hielo y se centrifugó el homogenato resultante a 11000xg por 10 min. a 4°C y se determinó la actividad  $\beta$ -glucosidasa intracelular.

## Ensayo de actividad enzimática

Para medir la actividad glicosidásica se utilizaron los *p*-nitrofenil-glicósidos (*p*NP) como sustratos. Dependiendo de si la enzima estaba en forma soluble o inmovilizada, se adicionaron 0.1 mL de una solución o suspensión de la enzima en 2.45 mL de una solución de 5.5 mM de *p*NPG, 1.5 mM de *p*NPR y 1.5 mM *p*NPA disuelto en tampón acetato de sodio 0.1 M a pH 4.5 (tampón de actividad) y se incubaron con agitación moderada a 23°C. Se tomaron alícuotas (0.5 mL) a

intervalos de tiempo regulares a las cuales se les adicionó 0.5 mL de tampón carbonato de sodio 0,2 M, pH 10 para detener la reacción. El *p*-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a 400 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado fue  $18.300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol/min en las condiciones previamente mencionadas.

### **Determinación de proteínas**

La cantidad de proteínas fue determinada utilizando los procedimientos de Bradford (Bradford, 1976) o Lowry (Lowry et al., 1951).

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La electroforesis nativa (PAGE), desnaturalizante (SDS-PAGE) e isoelectroenfoque (IEF) fueron realizadas con el equipo Phast-System (Pharmacia LKB). Para la PAGE-SDS y PAGE se utilizaron geles homogéneos (Homo 12.5) y geles con gradiente (8-25%), respectivamente. El punto isoeléctrico (pI) se determinó usando un kit de calibración de pI en geles PhastGel IEF 3-9.

El revelado específico en los geles se realizó con el sustrato fluorescente (metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido) para la identificación de las bandas con actividad  $\beta$ -glucosidasa. Las proteínas en los geles de poliacrilamida fueron teñidas con plata.

### **Síntesis del gel MANA-agarosa (Mono-amino-etil-N-amino-etil)**

Los geles MANA-agarosa con bajo grado de activación (5 y 15  $\mu\text{moles/g}$  gel escurrido) se prepararon por oxidación directa de la agarosa con las cantidades estequiométricas deseadas de periodato de sodio, dado que la agarosa comercial (Sepharose CL-4B) contiene 15  $\mu\text{moles}$  de dioles oxidables por gramo de soporte escurrido. Para el gel de alta carga (75  $\mu\text{moles/g}$  gel escurrido), se siguió el protocolo descrito por Fernández-Lafuente (1993) en el cual la matriz (Sepharose CL-4B) fue activada con glicidol y posterior oxidación con periodato de sodio (gel glioxil-agarosa) como se describe en Guisán (1988) y Guisán (1997). Posteriormente los geles glioxil-agarosa (10 mL) conteniendo diferente carga de

grupos glioxil se suspendieron en 90 mL de etilendiamina 1M pH 10 y se mantuvieron en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 1 g de borohidruro de sodio sólido y esta suspensión se mantuvo en agitación durante 2 horas. Los soportes reducidos se filtraron y se lavaron secuencialmente con 100 mL de tampón acetato de sodio 100 mM a pH 4.0, 100 mL de tampón borato de sodio a pH 9.0 y finalmente con 500 mL de agua destilada. La conversión total de grupos glioxil en grupos amino permite tener una concentración de grupos amino primarios correspondientes al número inicial de grupos glioxil presentes en la agarosa. En este trabajo al gel MANA-agarosa se lo denominará: gel Amino-agarosa.

### **Purificación e inmovilización en gel Amino-agarosa**

Se incubó 1 g de gel Amino-agarosa escurrido con la fracción intracelular (15 UE, 65 mg proteína) en tampón acetato de sodio 5 mM pH 4.5 conteniendo NaCl 0.3 M. La suspensión se agitó a 4°C durante 2 horas y luego se filtró. El gel primeramente se lavó con tampón de actividad conteniendo NaCl 0.3 M en batch y luego conteniendo NaCl 0.4 M en columna. Posteriormente la enzima adsorbida al gel amino-agarosa fue eluida con NaCl 1.5 M en tampón de actividad. El desalado de la enzima se realizó en columnas PD-10 (Sephadex G 25) con tampón de actividad.

### **Modificación del nanoambiente del derivado $\beta$ -Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa.**

#### **a) Preparación de polialdehído-dextrano**

Los polialdehído dextranos (41 MW kDa y kDa 71) fueron obtenidos por oxidación total de los dextranos con periodato de sodio según lo reportado por Guisán et al., 1997.

#### **b) Preparación de poliamina-dextrano**

La poliamina-dextrano (PM =71 kDa) fue preparada por la reacción del poliadehído-dextrano respectivo con etilendiamina y posterior reducción con borohidruro de sodio como se describió anteriormente (Guisán et al., 1997).

#### **c) Modificación del derivado inmovilizado con polialdehido-dextrano**

Alícuotas de 1 g del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa fueron suspendidos en 4 mL de tampón fosfato de sodio 15 mM, pH 7.0 conteniendo 200 mM de trimetilaminoborano (TMAB). Se adicionó la solución de polialdehido-dextrano en

una proporción molar de polialdehído-dextrano: enzima de 10: 1. La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente bajo agitación muy suave durante 24 horas. Luego el derivado B–Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL se filtró y lavó con tampón de actividad.

*d) Modificación del derivado B–Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL con poliamina-dextrano.*

A 1 g del derivado B–Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL suspendido en 4 mL de tampón fosfato de sodio 0.2 M, pH 7.0 se adicionó la solución de poliamina-dextrano en una relación molar de poliamina-dextrano: enzima de 1:1. La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente bajo agitación muy suave durante 24 horas. Luego el derivado B–Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM se filtró y lavó con tampón de actividad.

A continuación, las bases de Schiff entre los grupos amina de la superficie de la enzima y del polímero poliamina-dextrano y los grupos aldehído del polímero de dextrano fueron reducidas a enlace amina secundaria. Para llevar a cabo la reducción se incubó el derivado B–Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM con 10 mL de tampón carbonato de sodio 40 mM, pH 9 suplementado con 10 mg de borohidruro de sodio se incubó a temperatura ambiente bajo agitación muy suave durante 45 minutos. Luego el derivado reducido de  $\beta$ -Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM se filtró y lavó exhaustivamente con tampón de actividad.

### **Inmovilización covalente sobre soportes epóxido**

*a)  $\beta$ -Glucosidasa de *Issatchenkia terricola**

La inmovilización de  $\beta$ -glucosidasa de *Issatchenkia terricola* en Eupergit C 250L se realizó incubando 5 mL del extracto enzimático (definido previamente) conteniendo 0,2 unidades de enzima (2 mg de proteína) con sulfato de amonio disuelto en tampón fosfato de sodio 1 M pH 7.0 por gramo de soporte escurrido. La suspensión se incubó durante 24 h a 4°C con agitación suave.

*b) Glicosidasas comerciales de *Aspergillus niger**

La co-inmovilización de las glicosidasas en Eupergit C se realizó incubando 5 mL de una solución del preparado comercial PCL5 (70 mg proteína) en tampón fosfato

de sodio 1M pH 7.0 por gramo de soporte escurrido. La suspensión se incubó durante 96 h a 23°C con agitación suave.

Posteriormente se procedió al bloqueo de los grupos epóxido que no han reaccionado con la enzima. El bloqueo se realizó incubando 10 mL de glicina 3M a pH 8.0 por gramo de derivado escurrido durante 24 horas a 4°C con agitación suave. Luego el derivado bloqueado fue lavado con abundante agua destilada y tampón de actividad y almacenado a 4°C.

### **Prueba de liberación de enzima (“leakage”)**

Los derivados inmovilizados covalentemente (100 mg derivado escurrido) fueron incubados con 1.0 mL de tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0 a 23°C con agitación durante 2 horas. El derivado inmovilizado fue separado por filtración y luego incubado con 1.0 mL de una solución de etilenglicol (30%) en 50 mM de tampón fosfato de sodio pH 7.0 a 23°C durante 2 horas. Luego se determinó actividad enzimática en las soluciones correspondientes a los derivados filtrados.

### **Estudios de estabilidad en diferentes condiciones**

En todos los experimentos de estabilidad los tiempos de vida media se definieron como el tiempo que tarda la enzima en perder el 50% de su actividad inicial en las distintas condiciones.

#### *Estabilidad térmica*

Los derivados enzimáticos se incubaron a diferentes temperaturas en condiciones de pH, fuerza iónica y concentración que se detallan en el pie de cada figura. Periódicamente, se tomaron muestras de las suspensiones y se midió la actividad enzimática remanente.

#### *Estabilidad en símil vino*

Los derivados enzimáticos fueron incubados en medio símil vino (a diferentes valores de pH) consistiendo el mismo de: etanol-agua (12:88 v/v), conteniendo 3.5 g/L de ácido tartárico, 2.5 g/L de ácido málico, 60 mg/L de metabisulfito de sodio. Periódicamente, se tomaron muestras de las suspensiones y se midió la actividad enzimática remanente.

### **Aislamiento de compuestos volátiles y glicósidos en vino Moscatel en cartucho ISOLUTE® ENV+.**

La extracción en fase sólida de los compuestos volátiles para el vino Moscatel se realizó utilizando cartuchos tipo ISOLUTE® ENV+ según el método puesto a punto por Carlin (1998). El procedimiento utilizado permite fraccionar los aromas libres y ligados a partir de 50 mL de vino, diluidos a 100 mL y adicionados de 0.1 mL de n-heptanol como estándar interno (0.229 g/ L en solución hidroalcohólica al 50%), con cartuchos Isolute® ENV+ rellenos con 1 g de polímero SDVB (estireno-divinilbenceno) (40-140 mm, cod n° 915-0100-C). Previo al pasaje de la muestra el cartucho se acondicionó eluyendo 15 mL de metanol, seguidos de 20 mL de agua. A continuación se adicionó la muestra seguida de 15 mL de agua. Luego, la fracción libre se eluyó con 30 mL de diclorometano, adaptando un sistema de presión controlada para tener un flujo de 4-5 mL/min. Se recogió el solvente orgánico con la fracción libre, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró hasta aproximadamente 3-4 mL en baño termostaticado a 40°C y previo al análisis cromatográfico se concentró hasta aproximadamente 0.5 mL en corriente de N<sub>2</sub>. Los compuestos en forma ligada se eluyeron con 30 mL de metanol. Se recogió el solvente, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se llevó a sequedad en rotavapor. El residuo se procesó como se describe a continuación.

### **Actividad β-glucosidasa sobre los glicósidos aislados**

El residuo de los compuestos ligados se retomó en 3 mL de tampón acetato de sodio 0.1M pH 5.0 y se adicionó 1 mL de la enzima en forma soluble o inmovilizada (PCL5 y β-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa). Se dejó reaccionar durante 24 horas a 23°C, luego se agregó 0.1 mL de estándar interno y se extrajo con 3 porciones de 2 mL de pentano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2:1 (v/v), centrifugando durante 10 min. cada vez para facilitar la separación. Inmediatamente antes de inyectar al cromatógrafo de gases se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró hasta 0.5 mL en corriente de N<sub>2</sub>.

### **Tratamiento enzimático del vino**

El derivado inmovilizado β-glu-*I.terricola*-Eupergit (1UE) y el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit (1,2 UE de BG, 0.08 UE de Ra y 0,3 UE de Ara) fueron incubados con un vino blanco Moscatel joven cosecha 2009 (750 mL ajustado a pH

4.0 con 2 M NaOH) a temperatura ambiente con agitación (vino tratado). Al mismo tiempo se incubó un control sin enzima, consistente en matriz (Eupergit C con los grupos epoxido previamente bloqueados con 3 M glicina), con el mismo vino en las mismas condiciones (vino control). Las mezclas fueron agitadas y se sacaron alícuotas a lo largo del tiempo para realizar los ensayos de Glicosil-Glucosa (G-G). El derivado inmovilizado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit fue reusado en las condiciones antes mencionadas. Después de eso, el derivado fue lavado con el tampón de la actividad y se midió la actividad enzimática remanente.

### **Determinación del índice Glicosil-Glucosa (G-G)**

Este método analítico fue utilizado para determinar la concentración de glicósidos en las muestras de vino Moscatel (tratadas con los derivados inmovilizados y en el vino control). Dicho método desarrollado por Williams et al., (1995) para la estimación de la concentración total de compuestos glicosilados en uvas, jugos y vinos, consiste en la hidrólisis de los glicósidos, con lo que se liberan cantidades equimolares de agliconas y D-glucosa. Posteriormente se determina la concentración de la glucosa liberada mediante un ensayo enzimático, determinándose así el índice Glicosil-Glucosa (índice G-G). En la Figura 1 se observa el esquema general del ensayo. Para el aislamiento de los glicósidos se utilizaron cartuchos Sep-Pack C18 y la elución se realizó con etanol. La hidrólisis total de glicósidos se realizó con 1.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 100°C al mismo tiempo que se incubó el correspondiente control. Se realizaron las curvas de calibración correspondientes para los controles y las muestras. A la concentración de glucosa de cada muestra se le restó la concentración de glucosa de cada control, obteniéndose la concentración de Glicosil-Glucosa ( $\mu$ M/mL) presente en cada muestra hidrolizada.

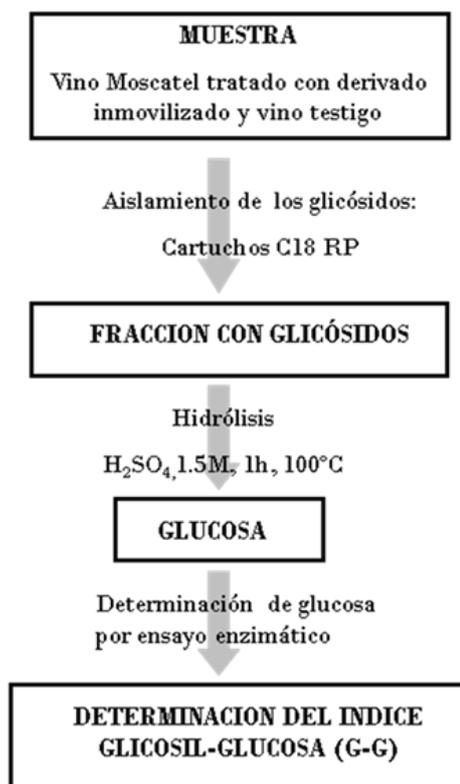


Figura 1. Esquema general del ensayo de Glicosil-Glucosa.

### Identificación de los compuestos aromáticos

La identificación de los compuestos volátiles presentes en uvas y vinos se realizó mediante GC-MS utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado con un detector de masa Shimadzu QP 5050 y equipado con una columna capilar de sílica fundida (25 m x 0.25 mm d.i.), con fase estacionaria BP 20 (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor) (SGE, Australia). Las condiciones de trabajo fueron: programa de temperatura 40°C (8 min), 40-180°C a 3°C/min, 180-220°C a 10°C/min, 220°C (20 min); temperatura del inyector, 250°C; modo de inyección split, relación de split 1:40, volumen inyectado, 1.0  $\mu\text{L}$ . Gas portador He, 92.6 kPa (55.9 cm/seg); temperatura de la interfase, 250°C; rango de masas, 40-400 uma.

La identificación se realizó utilizando bases de datos con espectros de referencia (Adams, 1995; McLafferty et al., 1991) y base de datos propia realizada con estándares y datos reportados en la literatura. La identificación de los compuestos se confirmó por medio de la determinación de índices de retención lineal (Kovats), obtenidos utilizando una mezcla de n-alcanos de referencia (C9-C26).

### **Cuantificación de los compuestos aromáticos**

La cuantificación de los compuestos volátiles presentes en uvas y vinos, se realizó por cromatografía gaseosa de alta resolución (HRGC) utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu modelo GC-14, equipado con detector de ionización de llama (FID) y software de procesamiento de datos Shimadzu EZ-Chrom. Se utilizaron las mismas condiciones y el mismo tipo de columna capilar descritos en la identificación por GC-MS. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector, 250°C; temperatura del detector, 280°C; modo de inyección split, relación de split 1:30; volumen inyectado, 0.5 µL.

### **Pruebas Sensoriales: Test triangular**

Este ensayo se realizó con el panel de jueces sensoriales de la Sección Evaluación Sensorial de la Facultad de Química. Se utilizaron copas normalizadas para cata (ISO 3591-1977) cubiertas con una placa de Petri, con 30mL de muestra a temperatura ambiente. Los vinos fueron presentados a los jueces en cabinas individuales con luz roja para enmascarar las posibles diferencias de color entre los mismos. Las muestras fueron evaluadas mediante un test triangular de olor ampliado, en el que se presentan a los jueces tres muestras, indicando que dos son iguales y una diferente. Los jueces tienen que señalar la muestra diferente y describirla (Sancho et al., 1999). El test triangular ampliado se realizó con las tres muestras obtenidas luego del proceso de aromatización: vino tratado con el derivado inmovilizado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit (1UE), vino tratado con el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit y vino testigo. La boleta de evaluación utilizada se muestra en la Figura 2.

**BOLETA DE EVALUACIÓN  
TEST TRIANGULAR**

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Instrucciones:

Ud. Recibirá 3 sets con tres muestras cada uno. Dos de estas muestras son idénticas y la otra es diferente.  
Por favor, huela las muestras del primer grupo de izquierda a derecha.  
Seleccione la muestra diferente y descríbala  
Repita la misma operación para el segundo y el tercer set de muestras.

SET	MUESTRA DIFERENTE	DESCRIPCIÓN
1		
2		
3		

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN.

**Figura 2. Boleta de evaluación sensorial correspondiente al test triangular.**



## **RESULTADOS Y DISCUSION**

---

### **1. Selección e identificación de cepas con actividad $\beta$ -glucosidasa.**

Actualmente, existe un gran interés de los enólogos en el desarrollo de nuevas herramientas y técnicas que permitan diferenciar sus vinos en un mercado cada día más exigente. Dentro de éstas, se destacan las relacionadas con la elección de las levaduras, las cuales desempeñan un papel relevante en las características organolépticas de un buen vino (Lambrechts y Pretorius, 2000). En el proceso de fermentación de un vino que ocurre en forma natural y espontánea, participan las levaduras que se encuentran en la uva y en la biota presente en la bodega. La microflora de la uva es muy variable, encontrándose varios géneros (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*) los cuales predominan al inicio de la fermentación alcohólica y luego desaparecen, siendo el género *Saccharomyces* el que domina el proceso de vinificación (Fleet et al., 1984). Sin embargo, debido a que el crecimiento controlado de estas especies nativas puede llegar a enriquecer la complejidad aromática y sensorial de los vinos, en la actualidad el proceso de vinificación se lleva a cabo con levaduras seleccionadas y preferentemente nativas (Egli et al., 1998). Esta complejidad aromática puede atribuirse en gran parte a la producción y secreción de diversas enzimas por las levaduras, pero la más interesante desde el punto de vista enológico es la  $\beta$ -glucosidasa, por lo que existe un gran interés en la selección de levaduras productoras de dicha enzima para enriquecer el carácter varietal de los vinos (Jolly et al., 2006; Swiegers et al., 2005).

#### **Screening de actividad $\beta$ -glucosidasa**

Para este estudio se partió de una colección de 60 cepas *Saccharomyces* y cepas de levaduras nativas no-*Saccharomyces*, aisladas de uvas y mostos procedentes de viñedos uruguayos. La selección de levaduras con actividad  $\beta$ -glucosidasa se realizó por un método rápido en placas de Agar-Esculina conteniendo glicerol, como se describió en Métodos (Eberhart et al., 1964). Las levaduras productoras de  $\beta$ -glucosidasa hidrolizan la esculina, transformándola en glucosa y esculetina. Esta última reacciona con la sal férrica del medio formándose

un halo marrón oscuro en torno a la levadura. Con la finalidad de seleccionar aquellas cepas más promisorias en vías de su posible uso en vinos, se utilizó como criterio de selección, el pH del medio y la presencia de importantes halos de actividad  $\beta$ -glucosidasa. De esta forma, del total de las 60 cepas estudiadas de la colección de Enología de Facultad de Química, se seleccionaron tres cepas: una de ellas por presentar el mayor halo de actividad  $\beta$ -glucosidasa a pH 5.5 (cepa 0023, Figura 1.1) y las dos restantes (cepas 0621 y 0605) por presentar actividad  $\beta$ -glucosidasa a pH 4.0 (Figura 1.2, a y b).

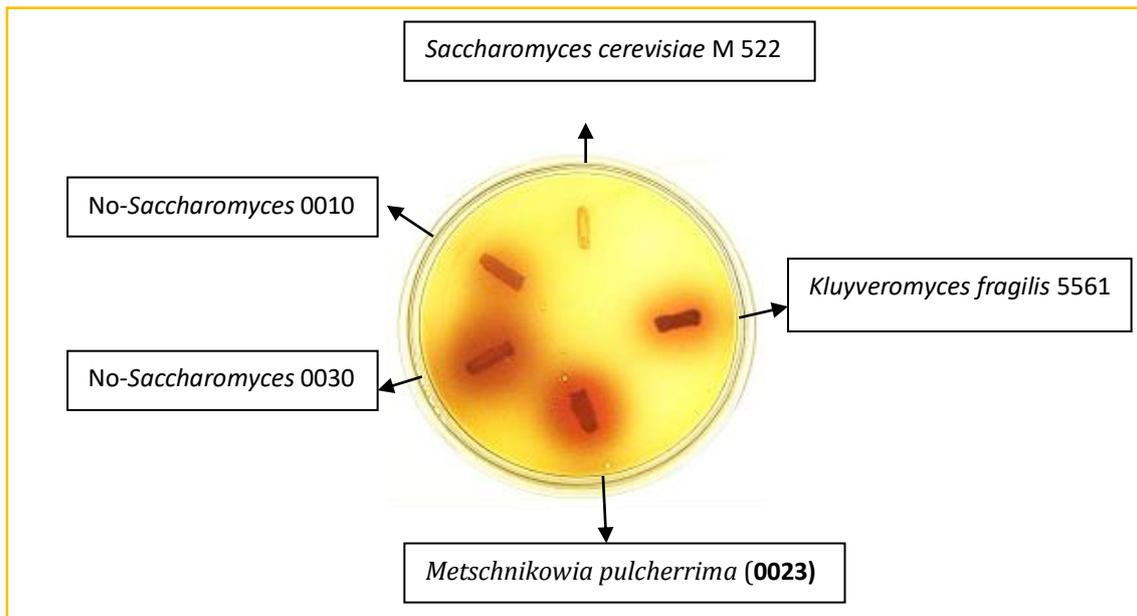


Figura 1.1 Ensayo cualitativo en placa a pH 5.5 de cepas productoras de actividad  $\beta$ -glucosidasa. Las cepas *S. cerevisiae* M522 y la cepa *Kluyveromyces fragilis* 5561 fueron usadas como controles negativo y positivo, respectivamente.

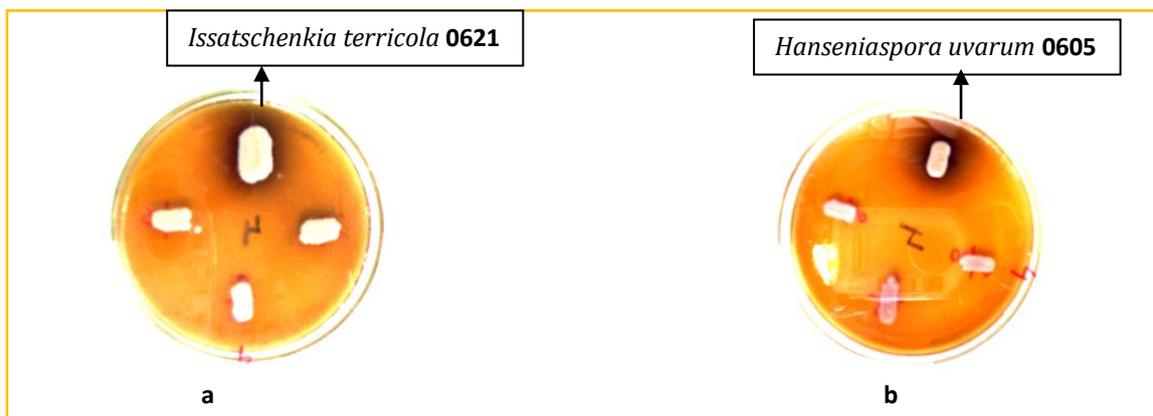


Figura 1.2 Ensayo cualitativo en placa a pH 4.0 de cepas productoras de actividad  $\beta$ -glucosidasa, cepa 0621 (a) y cepa 0605 (b). Las cepas restantes de cada placa corresponden a controles negativos.

### Identificación de cepas no-*Saccharomyces*

Las tres cepas no-*Saccharomyces* seleccionadas (**0023, 0621 y 0605**) fueron identificadas utilizando criterios moleculares y fisiológicos.

La cepa 0023 fue identificada como *Metschnikowia pulcherrima* en el Instituto de Fermentaciones Industriales de CSIC, Madrid, España.

La cepa 0621 y la cepa 0605 fueron identificadas como *Issatschenkia terricola* y *Hanseniaspora uvarum*, en el Depto de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo, Uruguay.

### Curvas de crecimiento de las cepas y producción de $\beta$ -glucosidasas

A diferencia de las cepas *Saccharomyces*, son numerosos los reportes de actividad  $\beta$ -glucosidasa en cepas no-*Saccharomyces* (Rosi et al., 1994; Cordero Otero et al., 2003). Los reportes publicados difieren con respecto a las cepas utilizadas, a la biosíntesis (constitutiva o inducida) y a la localización de la enzima en los cultivos celulares (Villena et al., 2007).

En este trabajo, se estudió la producción de la actividad  $\beta$ -glucosidasa para las tres cepas seleccionadas (*M. pulcherrima*, *I. terricola* y *H. uvarum*) en relación con la etapa fisiológica de la célula así como la influencia de la celobiosa (0,5%) como posible inductor de la producción de la actividad  $\beta$ -glucosidasa. Los experimentos fueron realizados en triplicado y se muestran los resultados de las desviaciones estándar.

#### *Metschnikowia pulcherrima*

En la Figura 1.3 se muestra el efecto inductor de la celobiosa en la producción de la actividad  $\beta$ -glucosidasa por *Metschnikowia pulcherrima*. A su vez se observa que dicha actividad es mayoritariamente intracelular (Figura 1.3B), alcanza un máximo al final de la fase de crecimiento (0.037 UE/mL) y luego disminuye considerablemente a 0.004 UE/mL. Recién después de un período de 4 días la actividad extracelular de la enzima aumentó a 0.013 UE/mL y se mantuvo constante durante la fase estacionaria, lo que indica que esta actividad podría surgir de la rotura de las células durante esta etapa por lo que se decidió concentrar esfuerzos en la purificación y caracterización de la enzima intracelular.

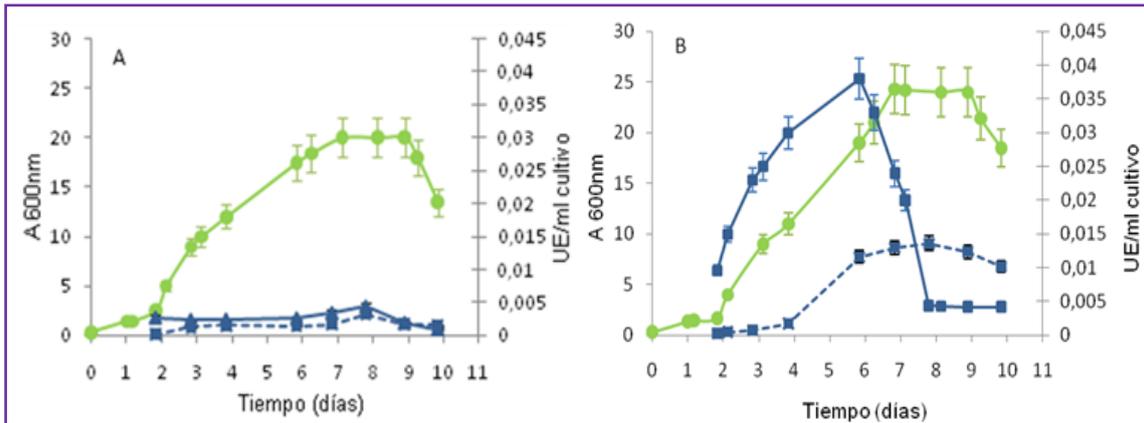


Figura 1.3 Cinética de producción de la  $\beta$ -glucosidasa extra e intracelular de *Metschnikowia pulcherrima* en ausencia (A) y presencia de celobiosa (B). ● Abs 600 nm; --- Enzima extracelular (UE/ml cultivo); ■ enzima intracelular (UE/ml cultivo).

### *Issatschenkia terricola*

Para la *Issatschenkia terricola*, la producción de la actividad  $\beta$ -glucosidasa extracelular es notablemente superior que la actividad intracelular, alcanzando un máximo al final de la fase de crecimiento (0.002 UE/mL) y, luego, disminuye lentamente (Figura 1.4). La enzima no es inducida por celobiosa ya que no se observaron cambios significativos en el perfil de producción de la actividad intra- y extracelular cuando se adicionó celobiosa al medio de cultivo.

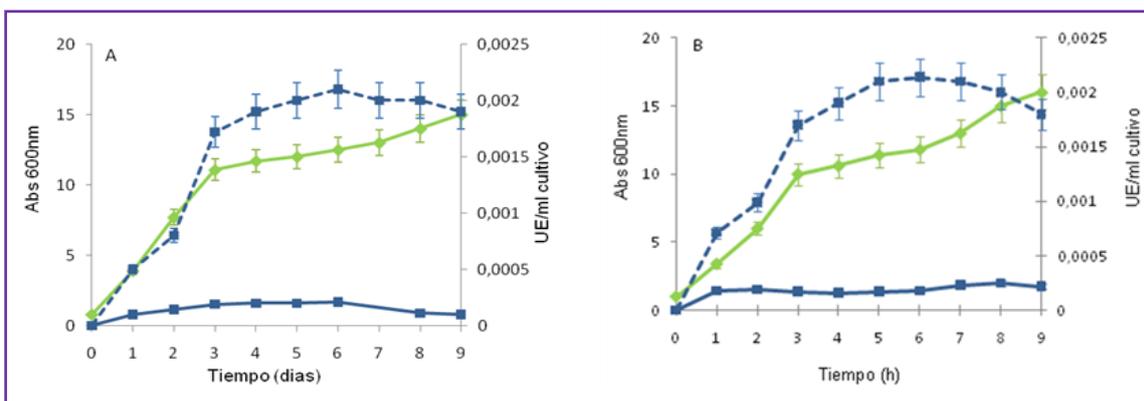


Figura 1.4 Cinética de producción de la  $\beta$ -glucosidasa extra e intracelular de *Issatschenkia terricola* en ausencia (A) y presencia de celobiosa (B). ● Abs 600 nm; --- Enzima extracelular (UE/ml cultivo); ■ enzima intracelular (UE/ml cultivo).

### *Hanseniaspora uvarum*

Como se observa en la Figura 1.5, la  $\beta$ -glucosidasa producida por *Hanseniaspora uvarum* también es de carácter extracelular, presentando un pico

máximo de producción menor de 0,001 UE/mL y dicha enzima no es inducible por celobiosa.

Dada su baja capacidad de producción, esta cepa fue descartada porque era muy dificultoso obtener cantidades razonables de enzima para su purificación y posterior caracterización.

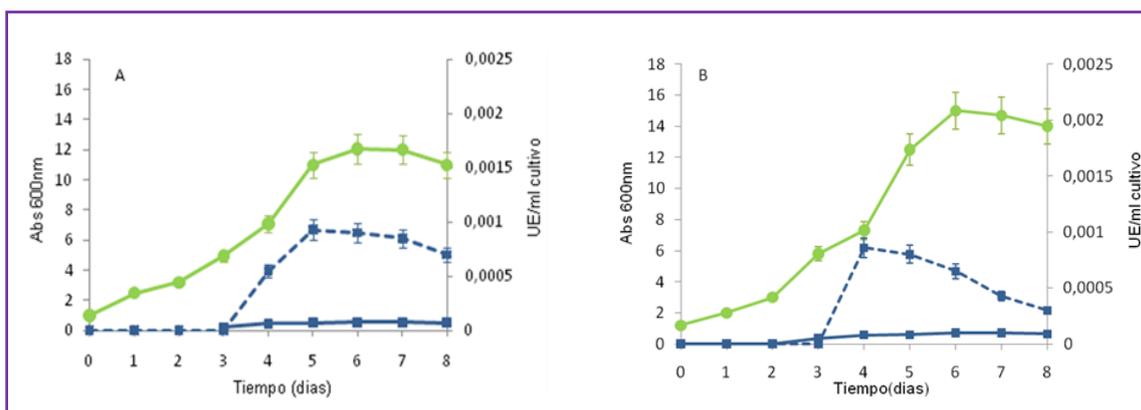


Figura 1.5 Cinética de producción de la  $\beta$ -glucosidasa extra e intracelular de *Hanseniaspora uvarum* en ausencia (A) y presencia de celobiosa (B). ●—Abs 600 nm; ■—■—Enzima extracelular (UE/ml cultivo); ■—■—enzima intracelular (UE/ml cultivo).

## Conclusiones

Por lo tanto, como resultado del análisis de actividad enzimática de las cepas se seleccionaron tres cepas posibles productoras de  $\beta$ -glucosidasa: *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatschenkia terricola* y *Hanseniaspora uvarum*.

La  $\beta$ -glucosidasa de la cepa *Metschnikowia pulcherrima* presenta muy buena actividad a pH 5.5 en presencia de esculina en el medio. Se encontró que dicha enzima es de origen intracelular y su biosíntesis es inducible por celobiosa.

La cepa *Issatschenkia terricola* presentó muy buena actividad  $\beta$ -glucosidasa a pH 4.0, propiedad muy interesante en vías de su posible uso enológico. Dicha enzima es de origen extracelular y no es inducible por celobiosa.

Por último, la cepa *Hanseniaspora uvarum* si bien presentó actividad  $\beta$ -glucosidasa a pH 4.0, la producción de la enzima extracelular por dicha cepa fue muy baja haciendo materialmente imposible estudiar dicha enzima a posteriori.

## 2. $\beta$ -glucosidasas de *Metschnikowia pulcherrima*.

Las glicosidasas de la uva y de *Saccharomyces cerevisiae* presentan muy limitada actividad en las condiciones de elaboración de vinos, por lo que una gran parte de los glicósidos presentes en el jugo de uva permanecen sin hidrolizar constituyendo una reserva potencial de aroma en el vino. Por esta razón, el rol de las glicosidasas exógenas, especialmente las  $\beta$ -glucosidasas está recibiendo cada vez más atención. Numerosos reportes indican que las levaduras nativas no-*Saccharomyces* producen glucosidasas intra- y extra-celulares las que podrían tener un efecto significativo en el desarrollo del aroma de los vinos (Jolly et al., 2006; Swiegers et al., 2005). Dado que la actividad de estas enzimas no ha sido extensamente estudiada, su efecto en el aroma del vino constituye un gran desafío a investigar. Si bien existe considerable información con respecto a la presencia de actividad  $\beta$ -glucosidasa en levaduras no-*Saccharomyces* dentro de los cuales se encuentra el género *Metschnikowia* (Tabla 2.1), la mayoría de las enzimas involucradas no han sido caracterizadas.

**Tabla 2.1 Principales actividades enzimáticas descritas en levaduras no-*Saccharomyces*.**

Actividad enzimática	Género
Proteasa	<i>Candida, Kloeckera, Pichia</i>
$\beta$ -Glucosidasa	<i>Candida, Debaryomyces, Hanseniaspora, Hansenula, Kloeckera, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Saccharomycodes, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces</i>
Esterasa	<i>Brettanomyces, Debaryomyces, Rhodotorula</i>
Pectinasa	<i>Candida, Cryptococcus, Kluyveromyces, Rhodotorula</i>
Lipasa	<i>Candida</i>

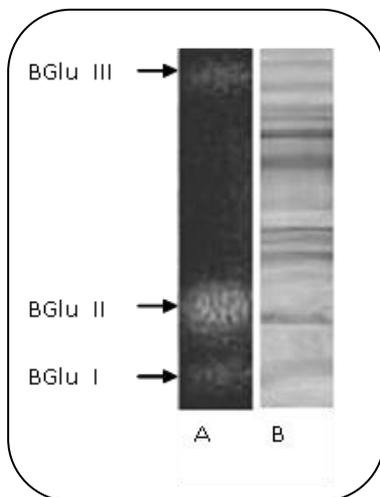
Adaptado de Esteve-Zarzoso et al., 1998

Por estas razones en este trabajo se purificó la  $\beta$ -glucosidasa de *Metschnikowia pulcherrima* y se caracterizaron sus propiedades incluyendo la actividad sobre los

glicósidos del vino. Se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la enzima, su estabilidad, así como su actividad y especificidad frente a diferentes sustratos.

**El extracto de *M. pulcherrima* presenta tres proteínas con actividad  $\beta$ -glucosidasa.**

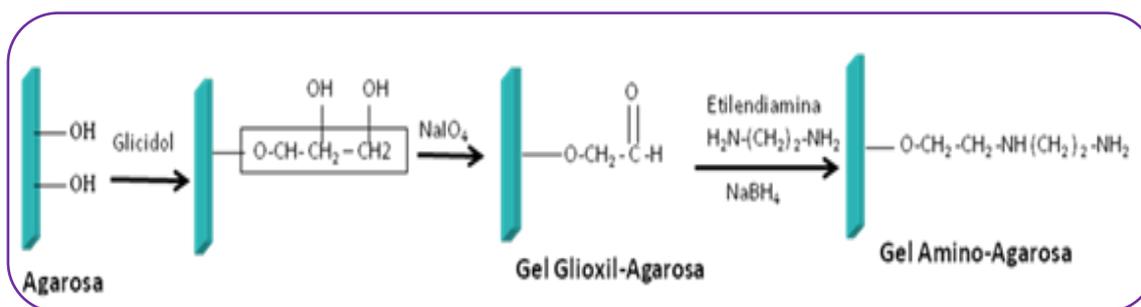
En la electroforesis del extracto celular en condiciones nativas (PAGE-Nativa) se observa un alto número de bandas de proteínas y la presencia de tres bandas con actividad  $\beta$ -glucosidasa, siendo la BGlu II la mayoritaria (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Electroforesis PAGE-nativa del extracto celular. Revelado con el sustrato fluorogénico (4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucósido) (Carril A) y tinción con plata (Carril B).

**Purificación e inmovilización de  $\beta$ -glucosidasa**

En este trabajo, la purificación de la  $\beta$ -glucosidasa se desarrolló en base a un método de intercambio iónico en geles amino-agarosa (Mono-Aminoetil-N-aminoetil-agarosa). Se optó por trabajar con intercambiadores iónicos sintetizados en el laboratorio, porque permiten gran versatilidad en su diseño, de acuerdo a las características de la proteína a purificar presente en el extracto celular. La síntesis de dichos geles implicó: i) la activación de la agarosa con glicidol; ii) oxidación con periodato de sodio dando el gel Glioxil-agarosa; y iii) reacción de los grupos aldehído del gel Glioxil-agarosa con la etilendiamina en presencia de borohidruro de sodio, obteniéndose el gel Amino-agarosa (Guisán et al., 1997) (Figura 2.2).



**Figura 2.2 Síntesis del gel Amino-Agarosa**

Se seleccionaron las condiciones para lograr la adsorción de la  $\beta$ -glucosidasa mayoritaria de *Metschikowia pulcherrima* al gel amino-agarosa para su purificación a homogeneidad en un solo paso y se estudió si esa adsorción permitía a la vez, su inmovilización con preservación de la actividad enzimática. Se estudió la influencia del grado de derivatización del soporte en el rendimiento de adsorción, para lo que se prepararon geles con diferente grado de activación, desde 5 -75  $\mu\text{moles}$  grupos amino/g gel humedo. Como se observa en la Tabla 2.2, para el caso de la mayor concentración de grupos amino por gramo de gel seco, la cantidad de proteína y actividad enzimática adsorbidas al gel alcanzaron respectivamente el 90% y 95 % de la carga aplicada (50 mg proteína y 10 UE/ g gel humedo) presentando la enzima ligada al soporte, una eficiencia de acoplamiento del 100% (9.5 UE).

**Tabla 2.2 Influencia del grado de activación del gel Amino-Agarosa sobre la adsorción de la  $\beta$ -glucosidasa.**

$\mu\text{moles}$ grupos amino/g gel humedo	Proteína adsorbida <sup>1</sup> (%)	Actividad inmovilizada <sup>2</sup> (%)	Eficiencia de acoplamiento <sup>3</sup> (%)
5	48	15	100
15	80	58	100
75	90	95	100

<sup>1</sup> (Proteína adsorbida /proteína aplicada) x100

<sup>2</sup> (Actividad adsorbida/actividad aplicada) x100

<sup>3</sup> (Actividad inmovilizada/actividad retenida) x 100

Se incubaron durante 1h 10 mL de extracto enzimático (15 UE, 65 mg proteína) en buffer acetato de sodio 5 mM pH 4,5 con 1g de gel amino-agarosa (peso de gel húmedo), a 4°C, con agitación suave.

Si bien no fue posible purificar la enzima de interés mediante la elución selectiva del intercambiador (González-Pombo et al., 2008, 1° publicación derivada de esta tesis), optimizando las condiciones de adsorción (pH y fuerza iónica), se

logró concentrar y aislar la BGluc II en una sola etapa. Mediante la inclusión de 0,3 M NaCl en la etapa de adsorción a pH 4,5, se obtuvo una preparación homogénea de la  $\beta$ -glucosidasa mayoritaria con un factor de purificación de 26 y rendimientos del orden de 38%.

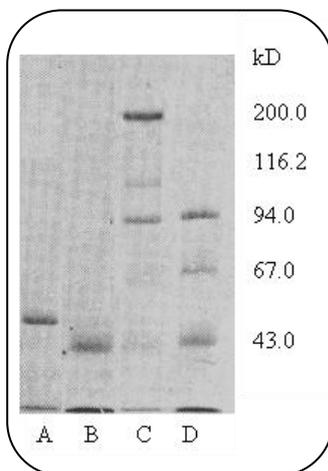
El uso del gel amino-agarosa con alta densidad de grupos amino primarios de bajo pKa (Guisán et al., 1997) resultó ser una buena alternativa al uso de los intercambiadores iónicos convencionales basados en agarosa que también se estudiaron pero no permitieron alcanzar los resultados antes mencionados. Esta adsorción a alta fuerza iónica permite inferir que la enzima presenta una alta densidad de cargas negativas en la superficie, y esta propiedad la diferencia de otras proteínas del extracto. A su vez, como se reporta en el artículo antes mencionado (González-Pombo et al., 2008), la enzima adsorbida al soporte amino-agarosa conteniendo 75  $\mu$ moles grupos amino/g gel humedo se encuentra fuertemente unida lo que permitió su utilización como biocatalizador inmovilizado. Estos resultados están de acuerdo a lo esperado, ya que la alta densidad de ligandos es un factor crítico que favorece la afinidad de una proteína por su adsorbente (Carlsson et al, 1998). Por estas razones, a pesar de que se trata de un método de inmovilización reversible, en este caso no se observó pérdida de enzima al medio.

La purificación y la inmovilización de la enzima de forma simultánea, permitieron obtener a la  $\beta$ -glucosidasa unida al intercambiador iónico de forma completamente activa.

### **Propiedades de la $\beta$ -glucosidasa purificada de *M. pulcherrima*.**

La preparación mostró una sola banda en la electroforesis SDS-PAGE presentando una masa molecular aparente de 49 kDa (Figura 2.3, carril A). La enzima BGlucII presentó una fuerte tinción con el Kit de detección de glicoproteínas, y luego de someterla a un proceso de deglicosilación enzimática, la  $\beta$ -glucosidasa migra como una única banda presentando una masa molecular de 45 kDa (Figura 2.3, carril B). Por lo tanto, su contenido de carbohidratos es aproximadamente el 8% del total del peso molecular. Este valor es comparable a

los obtenidos para otras  $\beta$ -glucosidasas de levadura, que suelen contener no más del 10% de carbohidratos (Gueguen et al., 1995). La masa molecular de la proteína nativa, determinada por gel filtración en una columna de BIOSEP-SEC-3000 es de 400 kDa. Debido a la presencia de hidratos de carbono, los valores de peso molecular informados aquí sólo pueden considerarse como estimaciones. En cuanto a la estructura de la  $\beta$ -glucosidasa, teniendo en cuenta el peso estimado de la proteína nativa y el peso determinado para la subunidad de 49 KDa, podríamos suponer que se trata de un octámero, coincidiendo con otras  $\beta$ -glucosidasas reportadas (Sanz-Aparicio et al., 1998; Umezurike et al., 1975).



**Figura 2.3** PAGE-SDS de la  $\beta$ -glucosidasa de *M. pulcherrima* purificada y desglicosilada (carriles A y B, respectivamente). Carriles C y D contienen los estándares de masas moleculares de (expresadas en kDa). La  $\beta$ -glucosidasa purificada fue desglicosilada utilizando el Kit de Desglicosilación químicas de Glycofree TM.

En la Tabla 2.3, se muestran las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la  $\beta$ -glucosidasa purificada.

Tabla 2.3. Características fisicoquímicas y cinéticas de BGluc II de *M. pulcherrima*.

Parámetros fisicoquímicos			Inhibición		Parametros cinéticos	
pH óptimo <sup>1</sup>	Temperatura óptima (°C) <sup>2</sup>	pl	Glucosa (100 g/L)	Etanol ≤12% (v/v)	Km <sup>3</sup> (mM)	Vmax <sup>3</sup> (UE/mg prot)
4.5±0.3	50	4.2±0.5	Si	No	1.5±0.2	0.8±0.09

<sup>1</sup> Estudiado en el rango de pH 3 - 10.

<sup>2</sup> Estudiado en el rango 23 - 80°C.

<sup>3</sup> Usando pNPG como sustrato a pH 4.5 y 23°C.

Los experimentos fueron realizados en triplicados y se muestran los resultados de las desviaciones estándar.

La enzima presenta una vida media de 2 días (a 4°C y pH entre 4.5–7.0). La estabilidad de la enzima decrece aún más al aumentar la temperatura, encontrándose a 23°C y pH 4.5 una vida media de 5 horas. A valores de pH ≤ 4.0 la enzima soluble precipita inmediatamente, inactivándose y limitando ampliamente su uso en forma soluble en vinos en donde el pH del mismo se encuentra en el rango 2,5-3,8. Por otra parte, se observó que el etanol no afecta su actividad.

### La inmovilización aumenta la estabilidad de la β-Glucosidasa de *M. pulcherrima*.

El biocatalizador amino-agarosa-β-GluII-*M.pulcherrima* (B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa) presentó a pH 4.0 una vida media de 12 horas, destacándose la importancia de la inmovilización como estrategia de estabilización ya que la enzima soluble a este valor de pH se inactiva inmediatamente.

Teniendo en cuenta las condiciones de pH y concentración de etanol que presenta el vino, se estudió la estabilidad a pH 3.5 así como el efecto del agregado de 12% de etanol sobre el derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa (Figura 2.4). La presencia de etanol 12%, mejora la estabilidad del biocatalizador inmovilizado a pH 3,5 a tiempos relativamente largos. Sin embargo, en ambas condiciones se observa que el derivado enzimático presenta una vida media de aproximadamente 3 horas. Este valor de vida media fue muy similar al observado cuando se estudió la estabilidad del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa en el medio símil vino

[etanol-agua (12:88 v/v), conteniendo 3.5 g/L de ácido tartárico, 2.5 g/L de ácido málico, 60 mg/L de metabisulfito de sodio].

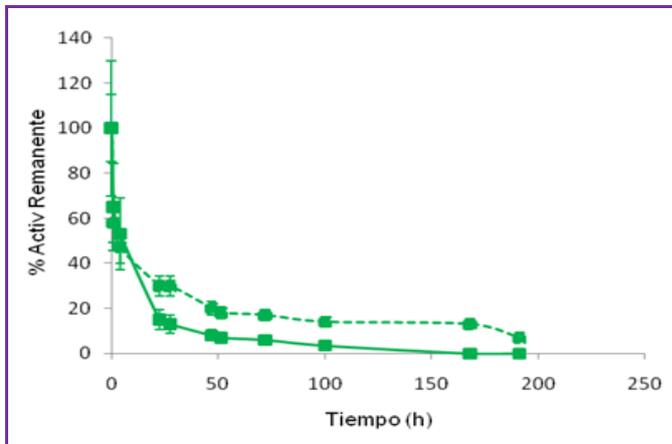


Figura 2.4 Efecto de la adición de etanol 12% sobre la estabilidad del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa (conteniendo 0.2 UE) a pH 3.5. --- pH 3.5/Etanol 12%; — pH 3.5. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

En cuanto a la estabilidad térmica, el derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa es notoriamente más estable que la enzima soluble tanto a 4°C como a 23°C (Figura 2.5), lográndose un factor de estabilización de 2 (de acuerdo a su vida media) a 23°C y mucho mayor de 10 a 4°C. Debido a que la enzima es muy sensible a temperatura ambiente, es importante trabajar a baja temperatura.

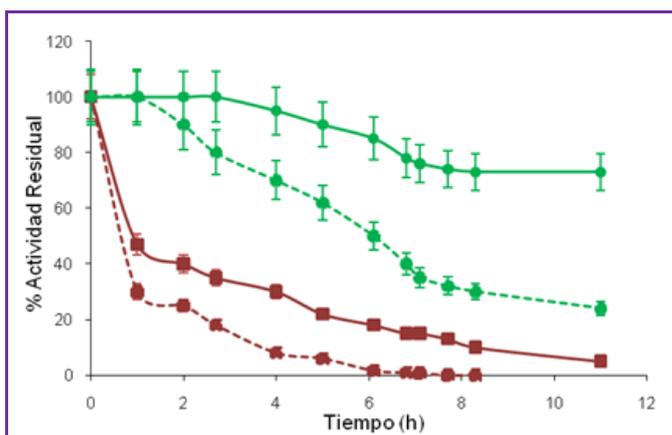


Figura 2.5 Estabilidad térmica de la B-GluII soluble y B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa a 4°C y 23°C (en buffer acetato, pH 4.5). B-GluII soluble: --- 23°C y — 4°C; B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa: --- 23°C y — 4°C. La cantidad de enzima soluble e inmovilizada incubada en el ensayo fue de 0.4 UE. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

**Modificación del nano-ambiente como estrategia adicional de estabilización.**

Frecuentemente la inmovilización de una enzima de por sí no es suficiente como estrategia única para alcanzar un alto grado de estabilización requerido, especialmente bajo condiciones adversas de pH, temperatura o presencia de solventes orgánicos. Dado que, para uso enológico es necesario obtener un derivado inmovilizado de mayor vida media en las condiciones del vino (pH 2.5-3.8 en presencia de etanol), se diseñaron estrategias complementarias para modificar el entorno que rodea las moléculas del biocatalizador inmovilizado para protegerla de los efectos agresivos del medio. Esta estrategia, reportada anteriormente para la estabilización frente a solventes orgánicos (Abian et al., 2001; Irazoqui et al., 2007) ha sido aplicada en esta tesis con el objetivo adicional de mejorar la actividad y estabilidad del biocatalizador frente al pH.

El derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa se modificó mediante un tratamiento de hidrofilización en dos etapas: primero con polímeros de polialdehído-dextrano, y posteriormente con polímeros de poliamina-dextrano (derivado amino PAL-PAM) (Figura 2.6). Esta estrategia supone la hidrofilización del nano-ambiente que rodea a la enzima inmovilizada, recubriéndola con un polímero policatiónico, que se espera pueda producir un corrimiento en la actividad y estabilidad hacia valores de pH más bajos por efecto de la alta concentración de cargas positivas en el entorno de la enzima. El método tiene como ventaja las propias de la inmovilización, más la protección del ambiente hidrofílico, esperándose cierta estabilización frente al pH y el etanol.

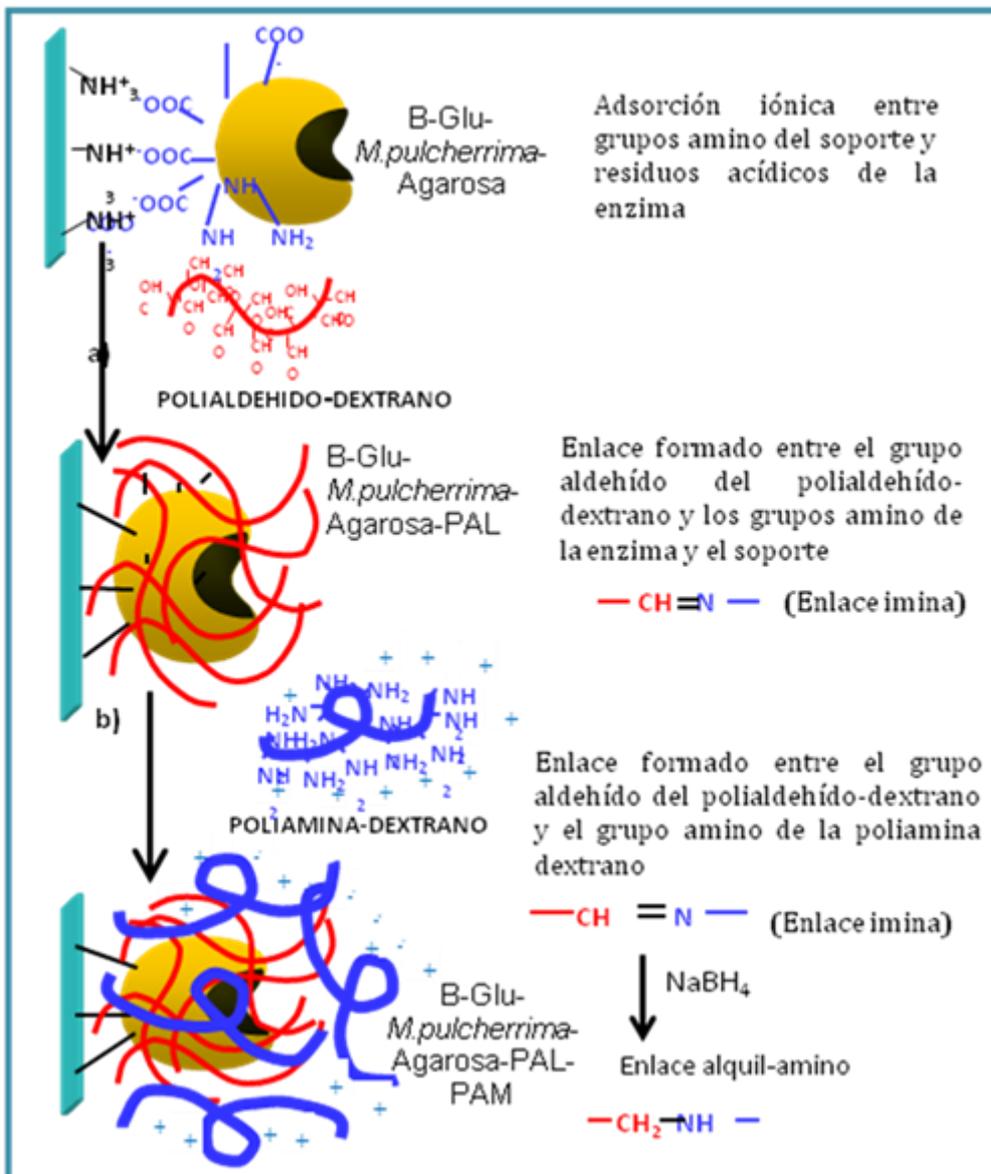


Figura 2.6 Estabilización de  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada, mediante modificación secuencial del nano-ambiente. Los detalles de la metodología se reportan en Métodos. Adaptado de Irazoqui et al, 2007.

La estabilidad del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa modificado (B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM) se estudió a pH 3.5 en medio similar vino. Como se observa en la Figura 2.7 se aprecia un incremento importante en la estabilidad del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM, aumentando la vida media en un factor de 4 con respecto al derivado sin modificar lo que confirma la hipótesis de trabajo planteada en relación a la modificación del nano-ambiente realizado. Si bien esto es positivo, es importante destacar que el proceso de modificación compromete considerablemente la actividad del biocatalizador

estabilizado PAL-PAM el que presenta una actividad residual del orden del 10% con respecto al biocatalizador sin modificar.

En este estudio entonces se logró obtener un biocatalizador inmovilizado (B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa) y otro modificado (B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM) con propiedades mejoradas de estabilidad a bajos valores de pH frente a la enzima en solución. Lamentablemente no es factible en la práctica trabajar con el derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM y evaluar su actividad sobre los glicósidos del vino debido a la baja actividad que presenta dicho biocatalizador. Por lo tanto, los estudios de actividad sobre los glicósidos del vino se realizarán con el derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa.

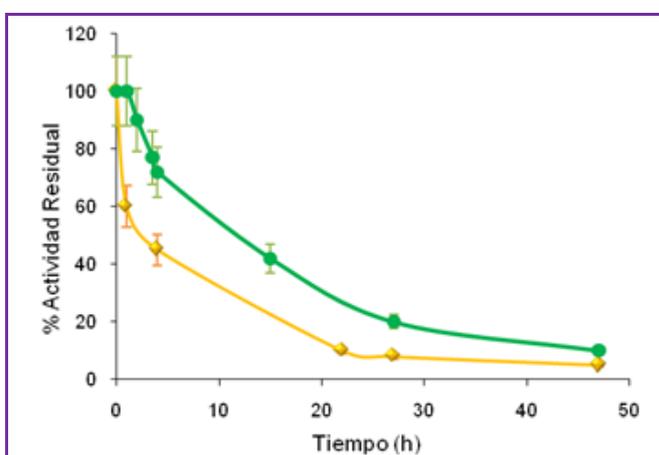


Figura 2.7 Estabilidad en símil vino a pH 3.5 y 4°C del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa (0.1 UE) (◆) y del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa-PAL-PAM (0.1 UE) (●). Los experimentos fueron realizados en triplicados.

### Actividad del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa sobre los glicósidos aislados de vino Moscatel

Se evaluó la actividad del derivado B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa (1 UE/g) sobre los glicósidos (3 mL) del vino Moscatel previamente extraídos (según la técnica reportada en Métodos) durante 24 horas, a pH 5.0 y temperatura ambiente. En la Tabla 2.4 se presenta el listado de los compuestos volátiles libres identificados por GC-MS luego del proceso de hidrólisis enzimática. Se obtienen compuestos terpénicos de interés como el nerol, geraniol y ho-diol. También se observa la hidrólisis de los precursores norisoprenoides, obteniendo como resultado el 3-oxo- $\alpha$ -ionol y la 3-hidroxi- $\beta$ -damascona. Estos resultados

demuestran que la  $\beta$ -glucosidasa de *M. pulcherrima* es activa frente a los glicósidos del vino Moscatel, su sustrato natural.

**Tabla 2.4 Concentración de los componentes volátiles de la fracción libre ( $\mu\text{g/L}$ ), obtenidos mediante hidrólisis enzimática con B-Glu-*M.pulcherrima*-Agarosa sobre los glicósidos del vino Moscatel.**

Compuestos	$\mu\text{g/L}$
Limoneno	14
Ac. Geránico	185
Nerol	19
Geraniol	19
Ho-diol	9
<b>Total terpenos</b>	<b>246</b>
3-Oxo- $\alpha$ -ionol	15
3-Hidroxi- $\beta$ -damascona	2
<b>Total norisoprenoides</b>	<b>17</b>
4-Vinil guaiacol	3
4-Vinil fenol	5
Acetovainillona	22
2,5 Dihidrobenczoato de metilo	48
<b>Derivados del Shikimico</b>	<b>78</b>

En conclusión, es importante destacar la importancia de la inmovilización como estrategia de estabilización, permitiendo mejorar la estabilidad del biocatalizador a valores de  $\text{pH} \leq 4.0$  y en símil vino. Por otra parte, si bien el biocatalizador modificado en su nano-ambiente fue más estable que el biocatalizador sin modificar, su actividad fue insuficiente para su aplicación biotecnológica en vinos. Por esta razón es importante evaluar las posibilidades que presentan las cepas seleccionadas en el análisis de actividad  $\beta$ -glucosidasa activas a  $\text{pH} 4.0$  (cepas 0621 y 0605).

### 3. $\beta$ -glucosidasa de *Issatschenkia terricola*.

Como se mencionó anteriormente, existen algunos reportes de  $\beta$ -glucosidasas aisladas de diversas especies no-*Saccharomyces* activas sobre glicósidos terpénicos de uvas (Grossman et al., 1987; Vasserot et al., 1989; Gunata et al., 1990; Rosi et al., 1994). Sin embargo, la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* no son activas y estables a bajos valores de pH, como se reportó en el capítulo anterior para *M. pulcherrima* (González-Pombo et al., 2008), *H. uvarum* (Barbagallo et al., 2004), *Z. baili* (Gueguen et al., 2008), and *P. pastoris* (Turan y Zheng, 2005). Considerando las eventuales aplicaciones enológicas de las  $\beta$ -glucosidasas y la baja estabilidad reportada de estas enzimas purificadas, la inmovilización se plantea como una buena estrategia de estabilización, posibilitando la caracterización de la actividad enzimática en condiciones enológicas. La inmovilización de enzimas además presenta varias ventajas: facilitar la separación y extracción de sustratos y productos del medio de reacción, y permite un mejor control de operación. Como ventaja adicional, la inmovilización hace posible el reuso del biocatalizador reduciendo los costos del proceso.

Por estas razones desde hace algún tiempo se ha planteado la inmovilización de  $\beta$ -glucosidasas como una herramienta con perspectivas interesantes para la aplicación enológica (Williams, 1993; Riccio et al., 1999). Sin embargo, la gran mayoría de los antecedentes de la utilización de estas enzimas en forma inmovilizada para aumentar el aroma de los vinos y jugos de frutas, concierne a preparaciones de glicosidasas comerciales, existiendo escasa información acerca de la inmovilización de  $\beta$ -glucosidasas de levaduras no-*Saccharomyces*.

Dado que la  $\beta$ -glucosidasa de *Issatchenkia terricola* podría ser promisoría en cuanto a su actividad y eventualmente su estabilidad a pH ácido según los resultados del screening realizado a pH 4.0 (reportado en Sección 1: Selección e identificación de cepas con actividad  $\beta$ -glucosidasa), es interesante profundizar en el estudio de las propiedades de dicha enzima.

Por lo tanto, en este capítulo se reporta la caracterización de la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* así como la inmovilización mediante la unión covalente a una resina acrílica comercial epoxi-activada denominada Eupergit C y su aplicación en vino Moscatel. Como primera aproximación para estudiar la actividad del biocatalizador sobre los glicósidos del vino se evalúa el cambio en el índice Glicosil-Glucosa.

#### **Determinación del índice G-G.**

Se realizó según método reportado por Williams y col. (1995) y descrito en Métodos.

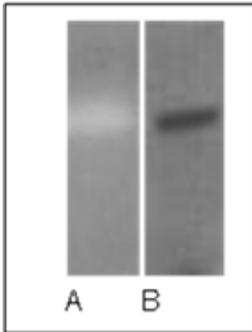
#### **Extracción, identificación y cuantificación de compuestos volátiles del vino Moscatel.**

La extracción de los compuestos aromáticos se realizó en fase sólida utilizando cartuchos ISOLUTE® ENV+. La identificación y cuantificación de dichos compuestos se realizó mediante GC-MS de acuerdo a lo descrito en Métodos.

#### **Aislamiento, inmovilización y caracterización de $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola*.**

##### ***Aislamiento de $\beta$ -glucosidasa extracelular***

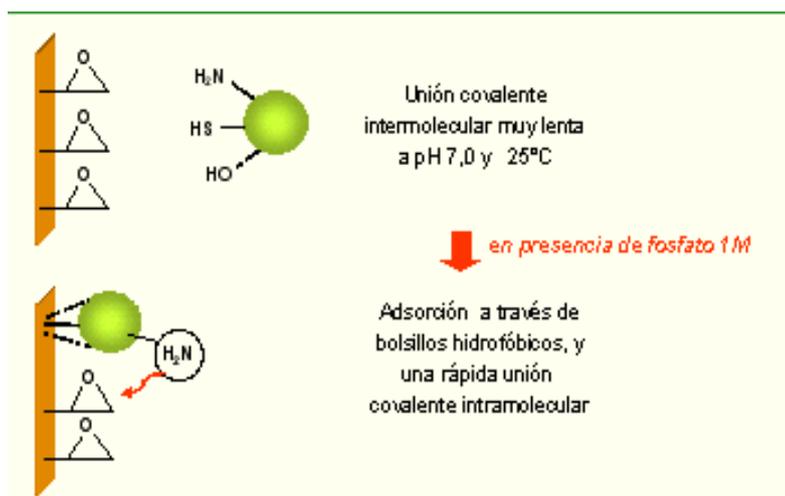
Dado que la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* es de origen extracelular, es esperable que se puedan desarrollar metodologías de purificación sencillas para facilitar su caracterización y posible uso industrial. En este trabajo se realizó una precipitación con sulfato de amonio (S.A. 70% saturación) como forma de concentrar las proteínas del sobrenadante del cultivo celular para poder obtener la enzima de interés (extracto enzimático). En la electroforesis de dicho extracto en condiciones nativas (PAGE-Nativa, Figura 3.1) se observa una sola banda proteica con actividad  $\beta$ -glucosidasa, lo que sugiere que la precipitación con S.A. permitió obtener una preparación homogénea y concentrada de la enzima de interés.



**Figura 3.1** Electroforesis Nativa en geles homogéneos (12.5%) del extracto enzimático de *Issatchenkia terricola*. La banda de actividad  $\beta$ -glucosidasa fue desarrollada mediante incubación del gel con una solución de 4-metil- $\beta$ -umbeliferil- $\beta$ -D-glucósido (5 mM) durante 10 min a 30°C (carril A), y posteriormente las proteínas fueron teñidas con plata (carril B).

### ***Inmovilización de $\beta$ -glucosidasa en Eupergit C***

La reacción covalente entre la proteína y el soporte Eupergit C a pH neutro es lenta, por lo que primero se debe promover la adsorción hidrofóbica de la proteína al soporte en presencia de alta fuerza iónica. Ese condicionante en nuestro caso resultó muy favorable ya que fue posible realizar la inmovilización de la  $\beta$ -glucosidasa directamente con el extracto extracelular precipitado por sulfato de amonio redissuelto en 1M fosfato de sodio a pH 7.0, por incubación durante 24 horas. Luego del acercamiento inicial por efecto hidrofóbico, la formación de uniones covalentes “intermoleculares” entre los grupos reactivos de la proteína (generalmente grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas) y los grupos epóxido del soporte se verá favorecida, debido al aumento de la concentración efectiva de estos grupos por la proximidad existente (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Mecanismo de inmovilización de proteínas en soportes epóxido. La reacción covalente intermolecular entre la enzima soluble y el soporte es extremadamente lenta. Sin embargo, la velocidad de la reacción covalente intramolecular entre la proteína previamente adsorbida y el soporte es mucho más rápida.

Como se muestra en la Tabla 3.1 (Gonzalez-Pombo et al., 2010, 2ª publicación derivada de esta tesis), el rendimiento y eficiencia de inmovilización disminuyen con el incremento de la carga enzimática en el rango estudiado (0.1 – 0.4 UE/g soporte). La máxima actividad inmovilizada (0,14 UE/ g soporte) se alcanzó cuando se aplicaron 0,2 UE (2 mg de proteína) por gramo de soporte. Por tanto, este biocatalizador inmovilizado fue utilizado en los experimentos que se reportan a continuación.

**Tabla 3.1** Influencia de la carga enzimática en la inmovilización de la  $\beta$ - glucosidasa.

Actividad aplicada (UE/g soporte) <sup>a</sup>	Rendimiento de inmovilización (%) <sup>b</sup>	Actividad ligada al soporte (UE/g)	Eficiencia de inmovilización (%) <sup>c</sup>
0.1 ± 0.006	100 ± 6.0	0.10 ± 0.008	100 ± 6.0
0.2 ± 0.012	90 ± 5.4	0.14 ± 0.01	80 ± 4.8
0.4 ± 0.024	60 ± 3.6	0.12 ± 0,009	50 ± 3.0

a Unidades de enzima por gramo de soporte seco.

b Relación entre las unidades de enzima retenidas y las aplicadas, considerando UE retenidas: diferencia entre las unidades de enzima aplicadas (UEA) y la actividad recuperada (UER) en sobrenadantes y lavados:  $[(UEA - UER) / UEA] \times 100$ .

c Relación entre la actividad ligada al derivado inmovilizado (UEI) y la actividad retenida  $[(UEI / (UEA - UER))] \times 100$ .

Actividad específica del extracto: 0.1 UE/mg de proteína.

Los resultados están expresados como la media ± coeficiente de variación de 3 repeticiones.

La alta densidad de grupos epóxido en la superficie de este soporte promueve la unión "multipuntual" de la proteína, no encontrándose liberación de  $\beta$ -glucosidasa al medio, lo que confirma la unión covalente entre la enzima y el soporte. Cuando la enzima se encuentra unida al soporte por más de un residuo, la posición relativa de los mismos permanece inalterada durante los posibles cambios conformacionales causados por la acción de cualquier agente que pudiera distorsionar la estructura de la enzima (calor, pH, solventes orgánicos, etc). De esta manera, la estabilidad de una enzima unida en forma covalente multipuntual al soporte es por lo general, mayor que la de la enzima soluble (Klivanov, 1982; Gupta, 1991; Guisán et al., 1997; Fernández-Lafuente et al., 1995).

Por lo tanto el soporte epoxi-activado Eupergit C, permitió desarrollar un protocolo muy simple de inmovilización de la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* ( $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit). La evaluación de su estabilidad se realizó en aquellas condiciones que son relevantes desde el punto de vista enológico.

#### ***Caracterización de la $\beta$ -glucosidasa de I. terricola.***

Con el objetivo de acercarse a comprender el posible rol de esta  $\beta$ -glucosidasa en el proceso de vinificación así como vislumbrar sus aplicaciones biotecnológicas, es importante estudiar la actividad y estabilidad de la enzima a bajos valores de pH, su tolerancia al etanol y glucosa así como frente a otros factores del vino. Adicionalmente, sería deseable que la especificidad de la enzima por las diversas agliconas fuera suficientemente selectiva como para desarrollar vinos con tipicidad característica, sensorialmente distinguibles de los obtenidos con las mezclas de glicosidasas comerciales.

La actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa en presencia de etanol 2M se ve incrementada a 115%, efecto previamente reportado debido a la actividad glicosiltransferasa de la enzima (Gueguen et al. 1995). En presencia de etanol 18 % v/v (5M) la enzima presenta una excelente actividad remanente, del orden del 90%. Esto, junto con la gran tolerancia que presenta (80% de actividad remanente) frente a las altas concentraciones de glucosa existentes en jugos de uva (hasta 100g/L), hacen que la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* tenga un gran potencial en la liberación de precursores aromáticos.

Dado que el pH es un factor limitante de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en vinos, se comparó el perfil de actividad con el pH de la enzima soluble con el de la enzima inmovilizada (Figura 3.3A). Si bien el pH óptimo del biocatalizador (pH 4.5) no fue afectado por la inmovilización, se observa a pH 3.0 un importante incremento en la actividad relativa del derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit (40%) frente a la enzima soluble (8%), favoreciendo la compatibilidad del biocatalizador con las condiciones enológicas. Con respecto a la temperatura, la  $\beta$ -glucosidasa soluble e inmovilizada presentan una actividad máxima a 50°C, observándose un desplazamiento del perfil de actividad en función de la temperatura del derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit hacia valores más altos, que podrían ser compatibles para otras aplicaciones no-enológicas (Figura 3.3B).

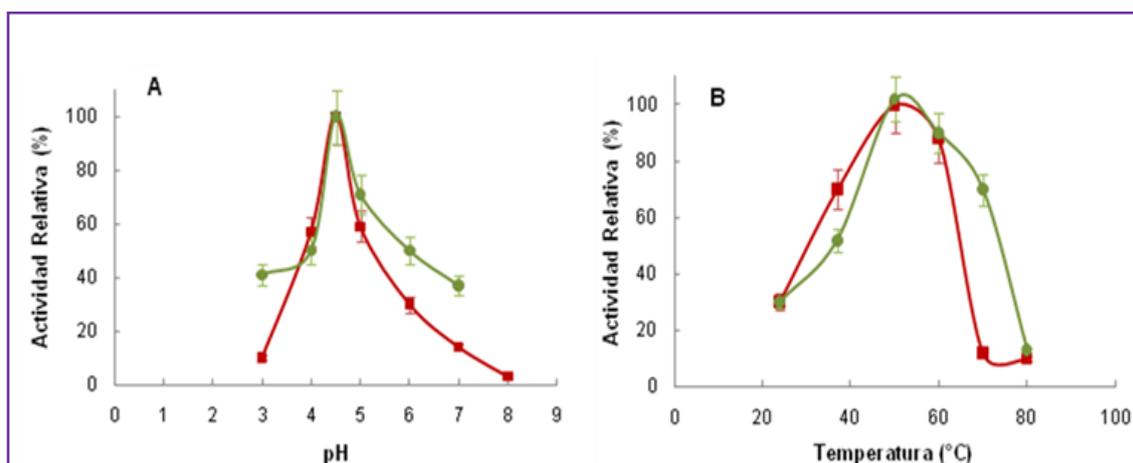


Figura 3.3 Actividad relativa de la  $\beta$ -glucosidasa soluble (■) y derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit (●) en función del pH (A) y temperatura (B), determinada con *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG). Los experimentos fueron realizados en triplicados.

#### ***La inmovilización estabiliza la $\beta$ -glucosidasa frente a bajos valores de pH.***

Con la finalidad de simular las condiciones reales encontradas en vino, se estudia el comportamiento de la  $\beta$ -glucosidasa de *Issatchenka terricola* en un medio similar vino a pH 3.0 y 4.0.

A pH 3.0, la enzima soluble mostró una pérdida total de la actividad luego de 2 horas, mientras que la enzima inmovilizada fue significativamente estabilizada obteniéndose una vida media de 2 días para el derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit (Figura 3.4 A). Cabe señalar que la estabilidad a pH 4.0 fue

notoriamente mejorada por el proceso de inmovilización. A pH 4.0 y a temperatura ambiente, la vida media de la enzima soluble fue de 2 días y el derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit, al segundo día alcanzó un estado estacionario de actividad enzimática constante manteniendo el 80% de su actividad, continuando hasta el final del experimento (16 días, Figura 3.4 B). En vino Moscatel a pH 4.0 la vida media del derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit a temperatura ambiente fue de 40 días (960 horas). Por lo tanto, la inmovilización de la  $\beta$ -glucosidasa de *Issatchenkia terricola* tuvo un fuerte efecto estabilizador a valores bajos de pH.

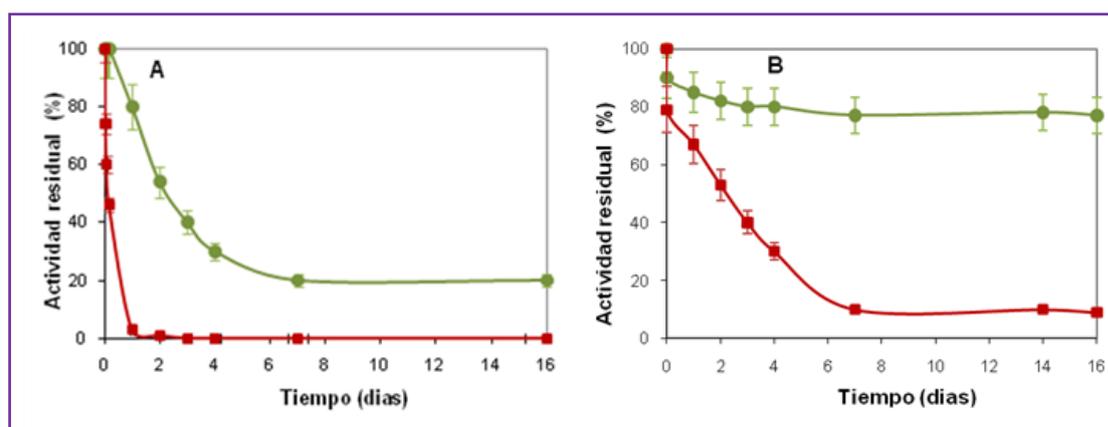


Figura 3.4 Estabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa soluble conteniendo 0.2 UE (■) y derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit conteniendo 0.2 UE (●) en similar vino a pH 3.0 (A) y pH 4.0 (B), a temperatura ambiente. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

Estos resultados son realmente destacables ya que las propiedades de estabilidad a pH ácido que presenta la  $\beta$ -glucosidasa de *Issatchenkia terricola* tanto en su forma soluble como inmovilizada son muy superiores a las obtenidas anteriormente con la enzima de *Metschnikowia pulcherrima* y con otras enzimas reportadas anteriormente. Por estas razones es posible llevar a cabo los estudios de aromatización directamente en vinos con el derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit para evaluar la actividad enzimática frente a su sustrato glicosídico natural y de esta forma aportar al conocimiento de nuevas enzimas provenientes de levaduras no-*Saccharomyces*, su impacto en el proceso de vinificación natural y posible aplicación para mejorar las características sensoriales de los vinos.

## Aplicación del derivado $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit en aromatización de vino blanco Moscatel.

### *La concentración de compuestos glicosilados disminuye por la actividad del derivado $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit*

Se determinó la concentración de glicósidos a lo largo de la reacción mediante el ensayo de G-G, como se describió en Métodos. Este ensayo consiste en la hidrólisis de los glicósidos, liberándose proporciones equimolares de agliconas y D-glucosa, determinando la concentración de esta última mediante ensayo enzimático (valor G-G).

Cuando se incubaba el derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit (1 UE) con el vino Moscatel, se observa una disminución muy importante del valor G-G de 130 a 66  $\mu$ M al cabo de los 16 días de tratamiento (Figura 3.5). El vino control sin tratamiento enzimático no presenta cambios significativos en el valor G-G durante el mismo período. Es importante destacar la estabilidad del derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit durante el experimento, ya que mantiene el 90% de su actividad inicial, lo que posibilita el re-uso del mismo en las mismas condiciones. El perfil obtenido durante el re-uso es muy similar al del primer uso, observándose una disminución del valor G-G de 125 a 70  $\mu$ M.

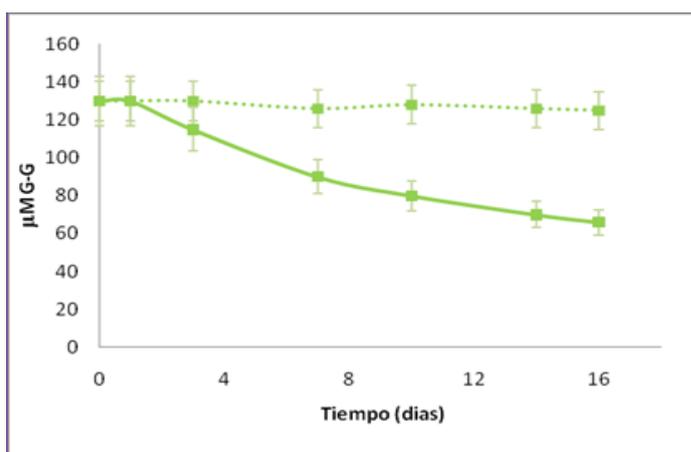
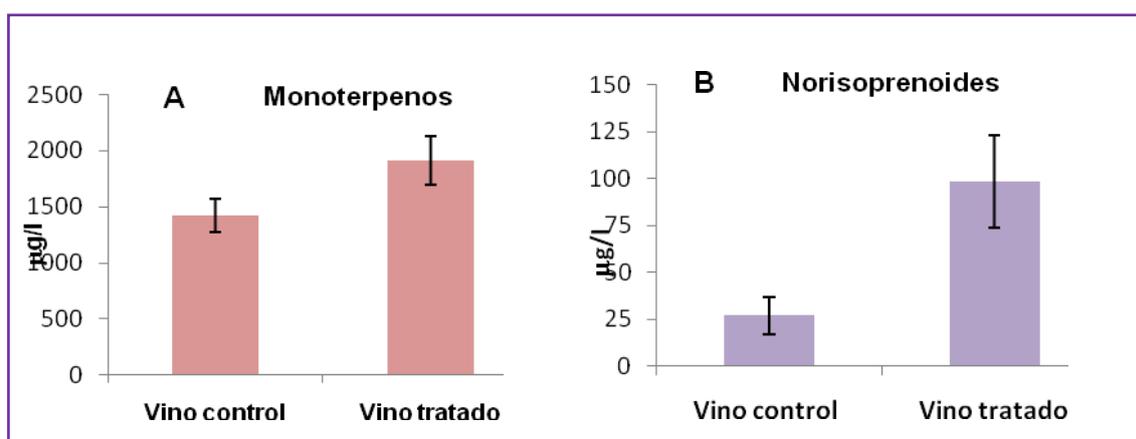


Figura 3.5 Efecto del derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit (■) en el contenido de glicósidos del vino Moscatel a pH 4.0. (●) Vino control. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

### **Liberación de compuestos aromáticos de interés.**

El resultado del análisis de GC-MS realizado luego de finalizado el tratamiento del vino Moscatel con el derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit y posterior aislamiento de volátiles en fase sólida, mostró un incremento significativo (determinado por análisis ANOVA), en monoterpenos (de 1420 a 1914  $\mu\text{g/L}$   $p < 0.05$ , Figura 3.6 A) y norisoprenoides (de 27 a 99  $\mu\text{g/L}$   $p < 0.01$ , Figura 3.6 B) con respecto al vino control.



**Figura 3.6** Efecto del derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit en el contenido de monoterpenos (A) y norisoprenoides (B) en vino Moscatel. “Vino tratado”: vino tratado con el derivado  $\beta$ -glu-*I.terricola*-Eupergit, “Vino control”: vino incubado con soporte Eupergit C (sin enzima), bloqueado con glicina bajo las condiciones reportadas en Métodos. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

### **Posible rol y aplicación de la $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* en enología.**

Para concluir, podemos decir que se intenta en este trabajo contribuir a la investigación sobre el papel de las levaduras no-*Saccharomyces* y su posible aplicación en la liberación de aromas del vino. De nuestro conocimiento, éste es el primer reporte sobre el aislamiento, caracterización e inmovilización de  $\beta$ -glucosidasa de *Issatchenkia terricola*, así como el estudio de su actividad sobre los glicósidos del vino. Esta enzima presenta varias características que hacen que sea una candidata muy interesante para contribuir al desarrollo de aromas en vinos. En primer lugar, y en contraste con la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de levaduras, la enzima de *I. terricola* es secretada al medio y presenta una mejor tolerancia al etanol (Palmeri, Spagna, 2007; Drider et al., 1993; Vasserot et al., 1989). Muchas  $\beta$ -

glucosidasas son inhibidas por la presencia de glucosa durante el proceso de fermentación, lo que limita su actividad y la liberación de compuestos volátiles aromáticos. A diferencia de la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de uva y hongos (Aryan et al., 1987; Lecas et al., 1991; Gunata et al., 1993), la enzima de *Issatchenkia terricola* es muy activa en altas concentraciones de glucosa, preservando el 80% de su actividad inicial en 100 g/L de glucosa. Por otra parte, mientras que la mayoría de las  $\beta$ -glucosidasas de levadura reportadas presentan bajos rendimientos a valores de pH que normalmente se encuentran en los vinos (entre 3.0 y 4.0), la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* es activa y relativamente estable a valores de pH mayores a 3.0. Por lo tanto, podría contribuir al aroma durante el proceso natural de fermentación.

En el presente estudio, se comprueba que la estabilidad de la enzima fue incrementada por la inmovilización, lo que facilita su uso en la aromatización de un vino blanco, permitiendo un mejor control del proceso de hidrólisis. Esto último es de primordial importancia para el tratamiento de los vinos jóvenes, ya que permite una liberación rápida y controlada de terpenos, lo cual favorece una venta rápida del producto, conservando una fracción de aromas ligados como reserva aromática potencial, a ser liberado en el tiempo.

Por lo tanto, hemos desarrollado un biocatalizador inmovilizado con propiedades muy adecuadas y buena funcionalidad en vino. Dicho biocatalizador inmovilizado muestra una estabilidad de almacenamiento muy buena y además, la vida media del mismo en condiciones enológicas (960 horas), es altamente competitiva si la comparamos con la vida media (1200 horas) de uno de los preparados comerciales más frecuentemente utilizados en enología (Cytolase PCI5) (Gallifuoco et al., 1999).

#### **4- Glicosidasas de *Aspergillus niger***

Actualmente existen en el mercado diferentes cócteles enzimáticos ricos en actividades glicosídicas procedentes de hongos filamentosos que han sido utilizados desde 1970 en la industria enológica. En términos de aplicación industrial, las preparaciones comerciales más ampliamente utilizadas, corresponden a glicosidasas de *Aspergillus niger*, microorganismo reconocido como seguro (microorganismo GRAS: Generally Regarded as Safe). La liberación de agliconas usando glicosidasas exógenas puede aumentar el aroma floral y frutal de vinos pero a menudo pueden generarse nuevos compuestos que influyen en el aroma del vino negativamente, tales como vinil-fenoles y vinil-guaiacol debido probablemente a la actividad cinamato esterasa que puede estar presente en estas preparaciones, conjuntamente con otras actividades enzimáticas laterales (diversas esterasas, antocianinas y polifenoloxidasas). Por estas razones existe un gran interés en el uso de enzimas con alto grado de pureza, habiéndose realizado esfuerzos substanciales para obtener nuevas preparaciones que no tengan efectos colaterales o no predecibles en el vino. Esto promovió la realización de estudios sobre la purificación y caracterización de nuevas enzimas de preparaciones fúngicas con actividades específicas. Lamentablemente los procedimientos de purificación desarrollados generalmente son costosos y conducen a preparados de estabilidad disminuida (Spagna et al., 1998). El problema de la baja estabilidad de las  $\beta$ -glucosidasas purificadas se puede compensar a través de la inmovilización o modificación química. Una ventaja adicional de la inmovilización es la de permitir un mejor control del proceso de hidrólisis, lo que como se mencionó anteriormente es una condición indispensable en la aplicación enológica. En cuanto a las propiedades de la  $\beta$ -glucosidasa de *Aspergillus niger*, la misma presenta características muy adecuadas para la liberación de monoterpenos en vinos tales como actividad óptima a pH 4.0-4.5 y buena actividad relativa a 25°C, a pesar de presentar inhibición por glucosa (Barbagallo et al., 2004).

Considerando lo anterior, en este capítulo se estudia el proceso de inmovilización de glicosidasas ( $\beta$ -D-glucopiranosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y

$\alpha$ -L- ramnopiranosidasa) de una preparación comercial mediante un método sencillo de inmovilización covalente en una resina acrílica epoxi-activada (Eupergit C). El principal objetivo es explorar el potencial uso de las glicosidasas inmovilizadas obtenidas para el enriquecimiento del aroma de un vino blanco Moscatel, evaluar los compuestos liberados y su comparación con el comportamiento del derivado inmovilizado de la enzima de la cepa nativa seleccionada (*I. terricola*). Como primera aproximación para estudiar la actividad del biocatalizador sobre los glicósidos del vino se evalúa el cambio en el índice Glicosil-Glucosa.

El trabajo presentado en este capítulo es reportado en el manuscrito: “Co-immobilization of multiple glycosidase activities from a commercial preparation for aroma enhancement of wines”, actualmente en revisión para ser sometido a publicación en revista internacional.

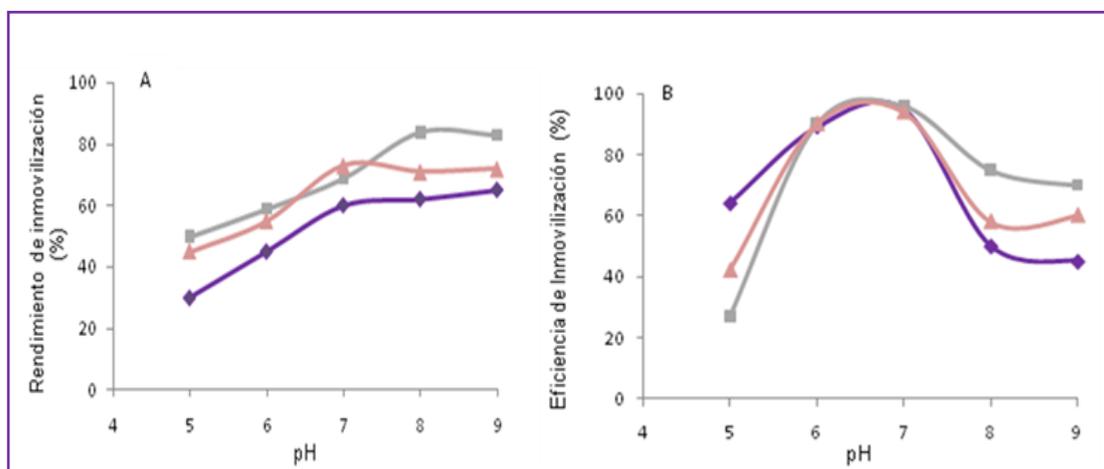
### **Optimización del proceso de inmovilización**

La reacción de inmovilización es un proceso complejo, en el que dos estructuras no complementarias, la superficie de una proteína y la superficie de un soporte se ven forzadas a reaccionar. Para lograr esto, se requiere una adecuada elección del soporte y un cuidadoso diseño de las condiciones de inmovilización (Mateo et al., 2007). Por lo tanto, hemos estudiado la influencia de diversas variables (pH de inmovilización, tiempo de reacción, concentración de sal y relación carga proteica: soporte) sobre el rendimiento y eficiencia del proceso de inmovilización.

Como se reportó anteriormente, el rendimiento de inmovilización se definió como la relación porcentual entre las UE retenidas y las aplicadas, calculando las UE retenidas como la diferencia entre la unidades de enzima aplicadas ( $UE_A$ ) y la actividad recuperada ( $UE_R$ ) en sobrenadantes y lavados:  $(UE_A - UE_R) / UE_A \times 100$ ). La eficiencia de inmovilización es la relación entre la actividad ligada efectivamente expresada por el derivado inmovilizado ( $UE_I$ ) y la actividad retenida:  $(UE_I / (UE_A - UE_R) \times 100)$ .

### Efecto del pH

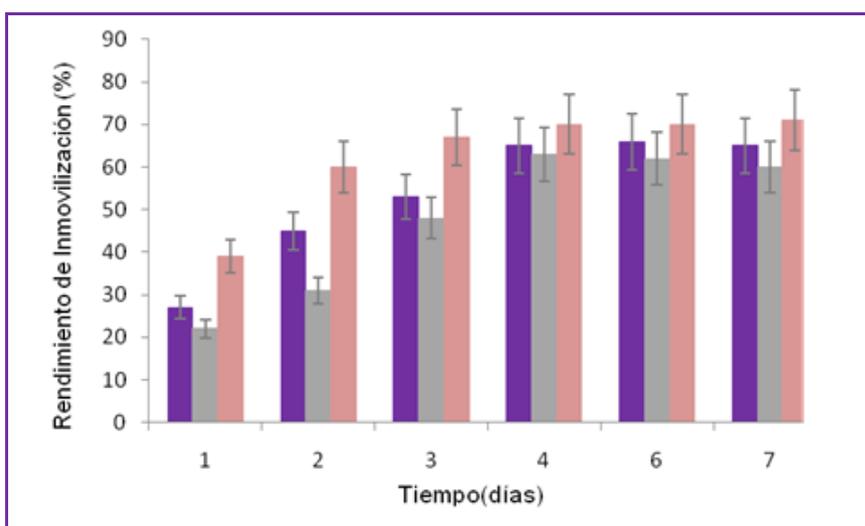
Como se mencionó en los capítulos anteriores, los grupos epóxido del Eupergit C pueden reaccionar con diferentes grupos que son muy abundantes en la superficie de la proteína, en una amplia gama de valores de pH (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000). De acuerdo con la mayor reactividad de los grupos nucleófilos presentes en las proteínas, el rendimiento de inmovilización aumenta con el aumento del pH en el rango de 5 a 9. Como se muestra en la Figura 4.1 A, las tres actividades glicosidásicas estudiadas: [ $\beta$ -D-glucopiranosidasa (BG),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (Ara) y  $\alpha$ -L-ramnopiranosidasa (Ra)], mostraron rendimientos de inmovilización muy buenos en comparación con otros reportes (Tu et al. 2006; Spagna et al. 2002). Sin embargo, la eficiencia de inmovilización disminuye considerablemente a valores de pH superiores a 7.0, de 95% al 50%, 75% y 58% para la BG, Ara y Ra respectivamente (Figura 4.1 B), posiblemente debido a la fuerte unión multipuntual de las enzimas a la matriz, lo que conduciría a cambios de conformación causando su inactivación. Por esta razón para la inmovilización se seleccionó el pH 7, teniendo en cuenta el compromiso entre el rendimiento y la eficiencia del proceso de inmovilización.



**Figura 4.1** Influencia del pH de acoplamiento en el rendimiento (A) y eficiencia (B) de inmovilización de las tres glicosidasas (■ Ara; ▲ Ra; ◆ BG) en tampón fosfato de sodio 1M, pH 7.0 durante 4 días con agitación a 23°C. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

### ***Influencia del tiempo de reacción***

A pesar de que la adsorción de la enzima al soporte puede ser muy rápida, el establecimiento de enlaces covalentes entre ellos es un proceso lento y dependiente del tiempo, que requiere la ubicación correcta de los grupos de la enzima hacia la superficie rígida del soporte (Tu et al., 2006; Mateo et al., 2000). En nuestras condiciones, el tiempo de incubación es muy importante para aumentar el rendimiento de inmovilización a pH 7.0. Tal como se observa en la Figura 4.2, el rendimiento de la inmovilización de las tres glicosidasas estudiadas aumentó durante los tres primeros días, alcanzando un máximo hacia el 4° día de incubación, con rendimientos de 65%, 63%, y 70%, para BG, Ara y Ra respectivamente. Luego de cuatro días de incubación se comprobó que las enzimas se encontraban covalentemente unidas al soporte, dada la ausencia de liberación de las mismas en la prueba de “leakage” (tratamiento con tampón de baja fuerza iónica y con etilenglicol, en las condiciones indicadas en Métodos).



**Figura 4.2** Rendimiento de inmovilización de glicosidasas (■Ara; ■Ra; ■BG) a diferentes tiempos de reacción en tampón fosfato de sodio 1M, pH 7.0 con agitación a 23°C. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

### ***Influencia de la concentración de sal.***

Como se esperaba, la eficiencia de inmovilización aumenta con el aumento de la concentración de sal para las tres glicosidasas estudiadas (Figura 4.3), alcanzando un valor máximo con 1M fosfato de sodio pH 7.0.

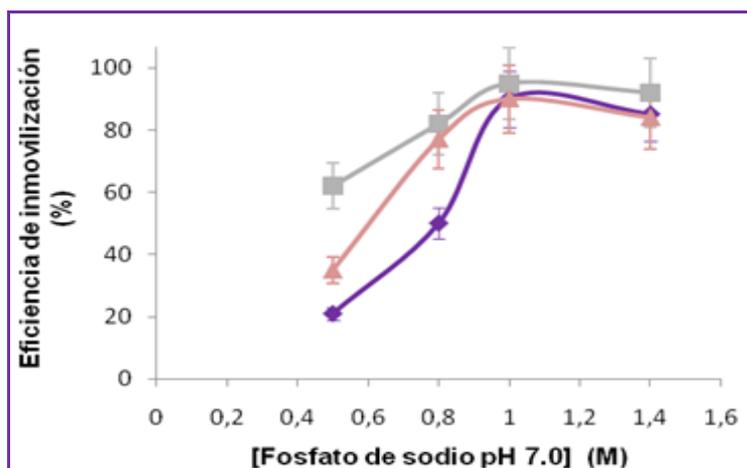


Figura 4.3 Efecto de la concentración del tampón fosfato de sodio pH 7.0 en la eficiencia de inmovilización de las glicosidasas (■Ara; ▲ Ra; ◆BG), luego de 4 días de incubación con agitación a 23°C. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

### *Influencia de la carga proteica en el proceso de inmovilización*

Como se observa en la Tabla 4.1, el rendimiento y eficiencia de inmovilización de las tres glicosidasas disminuyen con el incremento de la carga de proteínas en el rango estudiado (35 – 145 mg proteína/g soporte).

Tabla 4.1 Influencia de la carga proteica en la inmovilización de glicosidasas en tampón fosfato de sodio 1M, pH 7.0 durante 4 días con agitación a 23°C.

mg proteína aplicada/g soporte	Proteína unida		Rendimiento de inmovilización (%) <sup>a</sup>			Eficiencia de inmovilización (%) <sup>b</sup>		
	mg/g	%	BG	Ara	Ra	BG	Ara	Ra
35	22±2.1	63±6.0	68±6.0	85±8.5	77±7.5	83±8.1	91±9.0	100±9.0
70	42±4.0	60±6.2	70±7.1	65±6.0	75±7.5	89±8.5	92±9.0	88±8.0
145	48±4.1	33±3.1	33±3.1	43±4.2	49±4.2	76±7.2	55±5.3	80±7.5

<sup>a</sup> Relación entre las unidades de enzima retenidas y las aplicadas, considerando UE retenidas: diferencia entre la unidades de enzima aplicadas (UE<sub>A</sub>) y la actividad recuperada (UE<sub>R</sub>) en sobrenadantes y lavados:  $[(UE_A - UE_R) / UE_A] \times 100$ .

<sup>b</sup> Relación entre la actividad expresada por el derivado inmovilizado (UE<sub>I</sub>) y la actividad retenida:  $[UE_I / (UE_A - UE_R)] \times 100$

Los resultados están expresados como la media ± coeficiente de variación de 3 repeticiones.

La máxima eficiencia de inmovilización de las tres enzimas estudiadas (alrededor del 90%) se obtuvo incubando la preparación comercial (70 mg proteína por gramo de soporte) a 23 °C durante 4 días en tampón fosfato de sodio 1 M, pH 7.0. En estas condiciones, el derivado inmovilizado contiene 42 mg de proteína por gramo de soporte, expresando 7 UE/g de BG, 0,3 UE/g de Ara, y 1,4 UE/g de Ra. Los rendimientos de inmovilización alcanzados (alrededor del 70%) son muy buenos con respecto a los reportes anteriores (Mateo et al., 2007; Gallifuoco et al., 1988; Tu et al., 2006; Spagna et al., 2002; Tanriseven et al., 2005). Por tanto, este biocatalizador inmovilizado fue utilizado en los experimentos que se informan a continuación.

### **Actividad y estabilidad del biocatalizador inmovilizado**

El valor de pH óptimo para las glicosidasas solubles no se vio afectado por el proceso de inmovilización en el rango de pH estudiado (pH 3 a 8), presentando un pH óptimo en el entorno de 4.0 para las tres glicosidasas estudiadas.

Con respecto a la estabilidad, se estudió el comportamiento de las glicosidasas en medio similar vino a pH 3,5 y pH 4.0 para simular condiciones reales (Figura 4.4). Si bien la  $\beta$ -glucosidasa soluble de esta preparación comercial es estable, el proceso de inmovilización logró estabilizar particularmente la  $\alpha$ -arabinosidasa incrementando su actividad residual de 18 a 100% (factor de estabilización de 5) a pH 3.5 (Figura 4.4 A), y de 50 a 100% (factor de estabilización de 2) a pH 4.0 (Figura 4.4 B), luego de 70 días de incubación.

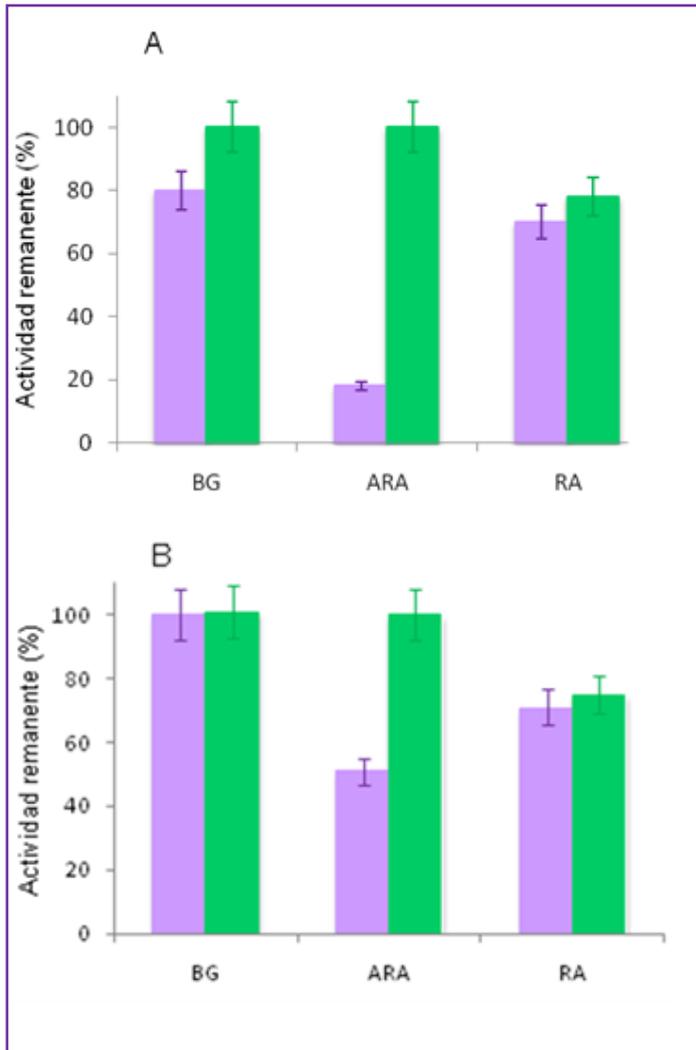


Figura 4.4 Estabilidad de glicosidasas en medio símil vino a pH 3.5 (A) y pH 4.0 (B) luego de 70 días de incubación a temperatura ambiente. Medio símil vino consiste en etanol-agua 12:88 (v/v) que contiene 3,5 g/L de ácido tartárico, 2,5 g/L de ácido málico y 60 mg/L de sulfito de sodio. ■ Enzimas solubles; ■ Biocatalizador inmovilizado. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

### El índice G-G disminuye por la actividad del derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit.

La actividad de las glicosidasas de *A.niger* sobre los glicósidos del vino Moscatel se evaluó con el derivado inmovilizado obtenido (glicosidasas-*A.niger*-Eupergit). El avance de la reacción fue monitoreado evaluando la concentración de glicósidos en función del tiempo, mediante el ensayo de Glicosil-Glucosa. Como se muestra en la Figura 4.5, se observó una disminución sustancial en el valor de G-G

de 120 a 80  $\mu\text{M}/\text{mL}$  en el transcurso de los 20 días de incubación del derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit con vino Moscatel. Después de este tiempo, el derivado inmovilizado se separó del vino y se analizaron los aromas liberados. El valor de G-G del vino control sin tratamiento enzimático se mantuvo prácticamente constante alrededor de 120  $\mu\text{M}/\text{mL}$  durante el período de incubación. El biocatalizador inmovilizado fue extremadamente estable en estas condiciones experimentales, preservando el 95% de su actividad inicial antes de la incubación con el vino Moscatel. Se logró un nivel de conversión equivalente al obtenido con *I. terricola*.

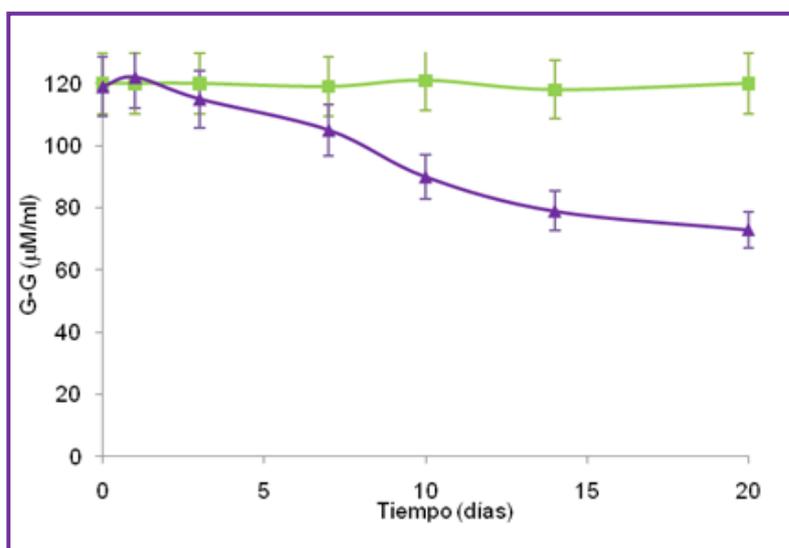


Figura 4.5 Efecto del biocatalizador inmovilizado en el contenido de glicósidos del vino Moscatel a pH 4.0 y 23 ° C.  $\blacktriangle$  Vino tratado con el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit;  $\blacksquare$  Vino control. Los experimentos fueron realizados en triplicados.

### Hidrólisis de compuestos glicosilados del vino

En general, se espera que la actividad glicosidásica sobre los precursores aromáticos del vino promueva la liberación de monoterpenos y norisoprenoides y consecuentemente el aroma varietal del mismo. En la Tabla 4.2 se presentan las concentraciones de los compuestos analizados mediante GC-MS en el vino Moscatel luego del tratamiento con el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit (Vino tratado). Se observa la liberación de monoterpenos (linalool,  $\alpha$ -terpineol y geraniol), así como norisoprenoides (vomifoliol y 3-oxo- $\alpha$ -ionol). El análisis de ANOVA mostró que el tratamiento enzimático del vino tiene un efecto significativo

en la liberación de agliconas, observándose un incremento en terpenos (de 1143 a 2131 $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,0172$ ) y norisoprenoides (de 0 a 27 $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,001$ ) con respecto al vino control sin glicosidasas.

**Tabla 4.2 Efecto del tratamiento del vino Moscatel con el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit en la concentración de los componentes volátiles.**

Compuestos aromáticos	Vino control ( $\mu\text{g/L}$ )	Vino tratado ( $\mu\text{g/L}$ )
Linalool	579 $\pm$ 43	615 $\pm$ 234
$\alpha$ -Terpineol	182 $\pm$ 12	246 $\pm$ 10
Geraniol	97 $\pm$ 5	438 $\pm$ 15
oxido A (trans-furánico del linalol)	47 $\pm$ 9	213 $\pm$ 46
oxido B (cis-furánico del linalol)	27 $\pm$ 5	99 $\pm$ 2
oxido C (trans-piránico del linalol)	151 $\pm$ 31	386 $\pm$ 28
oxido D (cis-piránico del linalol)	58 $\pm$ 7	135 $\pm$ 32
<b>Total terpenos</b>	1143 $\pm$ 94	2131 $\pm$ 122
Vomifoliol	nd	20 $\pm$ 1,7
3-Oxo- $\alpha$ -ionol	nd	7 $\pm$ 0.3
<b>Total norisoprenoides</b>	<b>nd</b>	<b>27 <math>\pm</math>1,9</b>

Los resultados están expresados como la media  $\pm$  coeficiente de variación de 3 repeticiones.

Del análisis de todos los compuestos detectados, es importante destacar que no se observó la presencia de compuestos contaminantes como vinil-fenoles y vinil-guaiacol, lo que estaría indicando que nuestro derivado de glicosidasas inmovilizadas no presenta actividades enzimáticas no deseadas. Este resultado se diferencia del obtenido cuando se utilizó la preparación comercial en forma soluble, lo que produjo una liberación comparable de terpenos y norisoprenoides, pero se detectó la presencia del compuesto 4-vinil guaiacol. Posiblemente, la inmovilización del preparado comercial en Eupergit C permitió una mayor eficiencia en la inmovilización de las glicosidasas de interés.

Por lo tanto, en este trabajo se ha desarrollado un método sencillo para la preparación de un biocatalizador inmovilizado con múltiples actividades glicosidásicas ( $\beta$ -D-glucopiranosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y  $\alpha$ -L-ramnopiranosidasa). Mediante la optimización del proceso se logró alcanzar eficiencias de inmovilización mayores al 80% y concomitantemente altas actividades expresadas para las tres enzimas estudiadas y buena funcionalidad en las condiciones de los vinos. Cuando el vino Moscatel fue tratado con el biocatalizador inmovilizado, la cantidad de monoterpenos y norisoprenoides libres se incrementó significativamente, lo cual confirma su actividad sobre los precursores glicosídicos. Debido a que los biocatalizadores inmovilizados tienen ventajas inherentes sobre la enzima soluble y a la ausencia de compuestos contaminantes en el vino tratado, este derivado es muy promisorio para las aplicaciones tecnológicas. Uno de los inconvenientes más conocidos de la utilización de los preparados comerciales solubles es la imposibilidad de controlar el proceso de hidrólisis, lo que se supera fácilmente mediante el uso de biocatalizador inmovilizado. Por otra parte, el derivado inmovilizado demostró una excelente estabilidad durante el proceso de aromatización, reteniendo el 95 % de su actividad inicial, lo que hace viable su reuso, con las ventajas que esto conlleva en una posible aplicación industrial.

## **5. Aromatización de vino Moscatel joven con los biocatalizadores inmovilizados**

Como se mencionó anteriormente, los precursores aromáticos glicosilados presentes en las variedades de *Vitis vinífera* tienen un rol fundamental en el aroma final del vino y a que la hidrólisis de estos compuestos glicosilados produce agliconas aromáticas de tipo terpénicas así como también compuestos norisoprenoides (Sefton et al., 1993; Williams et al., 1992). Debe recordarse que los monoterpenos, particularmente el linalol, geraniol y nerol, son responsables de los aromas característicos florales en uvas y vinos de los cultivares Moscatel, Gewürztraminer y Rielsing (Elber, 2001) y están relacionadas con la tipicidad aromática.

En este capítulo se reportan los estudios de aromatización realizados con la  $\beta$ -glucosidasa inmovilizada de *Issatschenkia terricola* en un vino Moscatel joven. El objetivo es caracterizar la actividad enzimática sobre los precursores aromáticos presentes en el vino, a través de la identificación y cuantificación de los compuestos liberados, así como la evaluación de su impacto sensorial en las propiedades aromáticas del mismo. Como referencia y con fines comparativos se evalúa el derivado obtenido con la preparación comercial, glicosidasas-*A.niger*-Eupergit.

### **Compuestos volátiles de la variedad Moscatel**

El aislamiento de los compuestos aromáticos se realizó mediante extracción en fase sólida utilizando una resina polimérica del tipo estireno divinil-benceno que se presenta en forma de cartuchos, ISOLUTE® ENV+ que presenta una superficie relativamente hidrofílica. La identificación y cuantificación de los compuestos aromáticos se realizó mediante GC-MS de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los principios de dichas técnicas fueron descritos en el Capítulo 1 (Introducción).

## Estudio de aromas

El análisis sensorial fue realizado mediante un test triangular ampliado por un panel de expertos de Sección Sensorial de Facultad de Química, según lo descrito en Métodos.

### **Liberación de compuestos aromáticos volátiles en vino Moscatel por la acción de $\beta$ -glucosidasas inmovilizadas.**

Se utilizó para este estudio un vino Moscatel joven ya que se sabe que esta variedad presenta un alto contenido en precursores glicosídicos y además éstos permanecen en alta proporción sin hidrolizar en el vino final (Villena et al., 2007).

La Tabla 5.1 presenta los resultados del análisis de compuestos aromáticos mediante GC-MS y HRGC en el vino tratado con los biocatalizadores inmovilizados de la levadura autóctona *Issatschenkia terricola* ( $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit) y de origen comercial (glucosidasas-*A.niger*-Eupergit) con respecto al vino control (sin tratamiento enzimático). Se presentan los valores medios de cada compuesto conjuntamente con la desviación estándar de la media. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,0172$ ) en los terpenos totales para las muestras tratadas enzimáticamente y el vino control. Dentro de estos compuestos terpénicos, cuatro compuestos presentaron diferencias a nivel de significación ( $p < 0,05$ ). Se observó un gran aumento en la concentración de geraniol, encontrándose diferencias significativas ( $p = 0,0017$ ) para los tres tratamientos.

Con respecto al linalol, se observa un incremento no significativo de su concentración en ambos tratamientos con respecto al control. Este resultado junto con el hecho de que el monoterpenil-glucósido del linalol es el que se libera en mayor proporción por la actividad enzimática de las levaduras durante la fermentación (Ugliano et al., 2006), podría sugerir que este compuesto se encuentre hidrolizado casi en su totalidad en el vino. Con respecto al  $\alpha$ -terpineol, se observa un comportamiento muy similar.

Por el contrario, la concentración de geraniol resultante de ambos tratamientos, se ve incrementada con respecto al control, siendo notoriamente mayor para el caso de la preparación comercial. Esta preparación enzimática posee además de la

$\beta$ -glucosidasa otras actividades glicosidasas las cuales podrían ser responsables, al menos en parte, de este notorio incremento de su concentración con relación al derivado de *I. terricola* que sólo presenta actividad  $\beta$ -glucosidásica.

Las concentraciones de los óxidos del linalol (A, B y C) también resultaron incrementadas significativamente debido a los tratamientos enzimáticos con ambos biocatalizadores.

Con respecto a los norisoprenoides, ambos tratamientos enzimáticos produjeron incrementos significativos ( $p < 0.001$ ) en la concentración de vomifoliol y 3-oxo- $\alpha$ -ionol en relación al control en el cual no se detectaron dichos compuestos. Para el caso del vino tratado con derivado  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit, este aumento de norisoprenoides totales es considerablemente mayor (53  $\mu\text{g/L}$ ) al valor obtenido con el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit (27  $\mu\text{g/L}$ ). En particular la diferencia más notoria entre ambos tratamientos enzimáticos dentro de este grupo se encontró para el 3-oxo- $\alpha$ -ionol, compuesto con un gran impacto sensorial.

**Tabla 5.1 Concentración de los componentes volátiles de la fracción libre ( $\mu\text{g/L}$ ), valores medios de 3 determinaciones para cada tratamiento y desviación estándar de la media. Valor de significación ( $p$ ) calculado por ANOVA para la diferencia entre los tratamientos y el control; letras superíndice distintas indican diferencias entre los tratamientos de las medias según Least Significant Differences (LSD) test (95%).**

Compuesto	Derivado glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit	Derivado $\beta$ -gluc <i>I. terricola</i> - Eupergit	Control	$p$
<b>Alcoholes</b>				
Alcohol isobutílico	1351 $\pm$ 71	1183 $\pm$ 83	1441 $\pm$ 98	0,2964
Alcohol isoamílico	30954 $\pm$ 379	26861 $\pm$ 904	30090 $\pm$ 4813	0,6289
1-Pentanol	33 $\pm$ 3	46 $\pm$ 12	23 $\pm$ 0	0,1371
Hexanol	744 $\pm$ 162	480 $\pm$ 52	493 $\pm$ 13	0,2607
3-Hexen-1-ol	89 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	60 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	0,0304
3-Metil tiopropanol	153 $\pm$ 30	100 $\pm$ 6	113 $\pm$ 4	0,2371
Alcohol bencílico	116 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	113 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	140 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	0,0310
Alcohol $\beta$ -fenil etílico	5977 $\pm$ 448 <sup>a,b</sup>	4695 $\pm$ 159 <sup>a</sup>	7219 $\pm$ 261 <sup>b</sup>	0,0226
Tirosol	3555 $\pm$ 77 <sup>b</sup>	1785 $\pm$ 44 <sup>a</sup>	4184 $\pm$ 75 <sup>c</sup>	<0,001
<b>Total</b>	42971 $\pm$ 660	35326 $\pm$ 945	43763 $\pm$ 5225	0,2598
<b>Esteres</b>				
Acetato de isoamilo	776 $\pm$ 13	733 $\pm$ 238	840 $\pm$ 67	0,8516
Hexanoato de etilo	409 $\pm$ 36	298 $\pm$ 42	323 $\pm$ 10	0,2263
Acetato de hexilo	45 $\pm$ 17	10 $\pm$ 1	23 $\pm$ 8	0,2804
Lactato de etilo	1875 $\pm$ 63	1709 $\pm$ 128	1439 $\pm$ 154	0,1634
Octanoato de etilo	1086 $\pm$ 239	439 $\pm$ 73	769 $\pm$ 43	0,0888
3-Hidroxy-butirato de etilo	231 $\pm$ 5	203 $\pm$ 9	220 $\pm$ 15	0,4051
Decanoato de etilo	132 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	79 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	258 $\pm$ 10 <sup>c</sup>	<0,001
Dietil succinato	289 $\pm$ 36 <sup>b</sup>	175 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	213 $\pm$ 19 <sup>a,b</sup>	0,044
4-Hidroxi-butirato de etilo	2238 $\pm$ 123 <sup>b</sup>	1440 $\pm$ 166 <sup>a</sup>	2209 $\pm$ 185 <sup>a</sup>	0,0501
Malato de dietilo	620 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	341 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	463 $\pm$ 57 <sup>a</sup>	0,0153
Succinato de etilo	9450 $\pm$ 977 <sup>a</sup>	6336 $\pm$ 591 <sup>a</sup>	14779 $\pm$ 869 <sup>b</sup>	0,0090
<b>Total</b>	17149 $\pm$ 1123 <sup>b</sup>	11764 $\pm$ 432 <sup>a</sup>	21527 $\pm$ 930 <sup>c</sup>	0,0075
<b>Ácidos</b>				
Ácido iso C4	218 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	122 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	146 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	0,0131
Acido butírico	189 $\pm$ 40 <sup>a</sup>	576 $\pm$ 68 <sup>b</sup>	564 $\pm$ 33 <sup>b</sup>	0,0147
Acido iso C5	22 $\pm$ 32 <sup>a</sup>	106 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	172 $\pm$ 33 <sup>b</sup>	<0,001
Acido hexanoico	4498 $\pm$ 221 <sup>b</sup>	3193 $\pm$ 211 <sup>a</sup>	2698 $\pm$ 68 <sup>a</sup>	0,0068
Acido octanoico	7678 $\pm$ 572 <sup>b</sup>	4884 $\pm$ 55 <sup>a</sup>	11474 $\pm$ 296 <sup>c</sup>	<0,001
Acido decanoico	1677 $\pm$ 43 <sup>b</sup>	779 $\pm$ 96 <sup>a</sup>	3230 $\pm$ 173 <sup>c</sup>	<0,001
<b>Total</b>	14742 $\pm$ 803 <sup>b</sup>	9657 $\pm$ 202 <sup>a</sup>	18283 $\pm$ 269 <sup>c</sup>	<0,001
<b>Terpenos</b>				
Linalol	615 $\pm$ 234	665 $\pm$ 114	579 $\pm$ 43	0,7190
$\alpha$ -Terpineol	246 $\pm$ 10	245 $\pm$ 20	182 $\pm$ 12	0,0844
Oxido A (trans-furánico del linalol)	213 $\pm$ 46 <sup>b</sup>	105 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	47 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	0,0254
Oxido B (cis-furánico del linalol)	99 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	27 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	0,0010
Oxido C (trans-piránico del linalol)	385 $\pm$ 28 <sup>b</sup>	350 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	151 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	0,0070
Oxido D (cis-piránico del linalol)	135 $\pm$ 32	103 $\pm$ 7	58 $\pm$ 7	0,1097
Geraniol	438 $\pm$ 15 <sup>c</sup>	225 $\pm$ 46 <sup>b</sup>	97 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	0,0017
<b>Total</b>	2131 $\pm$ 122 <sup>b</sup>	1743 $\pm$ 213 <sup>b</sup>	1143 $\pm$ 94 <sup>a</sup>	0,0172
<b>Norisoprenoides</b>				
Vomifoliol	20 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	22 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	0 (n.d.) <sup>a</sup>	<0,001
3-Oxo- $\alpha$ -ionol	7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	30 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	0 (n.d.) <sup>a</sup>	<0,001
<b>Total</b>	27 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	53 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	0 (n.d.) <sup>a</sup>	<0,001
<b>Otros</b>				
$\gamma$ -Butirolactona	626 $\pm$ 16 <sup>b</sup>	371 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	460 $\pm$ 36 <sup>a</sup>	0,0061

n. d= no detectado; significativo para  $p \leq 0.05$  y no significativo para  $p > 0$ ; <sup>a b c</sup> indican las diferencias entre los tratamientos.

### **La especificidad de las $\beta$ -glucosidasas está influenciada por la naturaleza de la aglicona.**

En relación a la actividad de las  $\beta$ -glucosidasas, se sabe que distintas enzimas presentan diferente afinidad por los sustratos (Van Rooyen et al., 2005). La especificidad y la actividad de la enzima dependen de la especie y cepa del organismo del cual proviene dicha enzima.

Existen diversas dificultades para caracterizar la actividad y especificidad de las glicosidasas. Por un lado, el uso de mezclas de glicosidasas en lugar de preparaciones homogéneas de enzimas, es una razón para concluir erróneamente y de forma imprecisa que las glicosidasas carecen de especificidad por la aglicona. Por otra parte, la utilización de sustratos sintéticos tales como benzil-, nitrofenil-, o 4-metilumbeliferil-glicósidos (4 MUG) puede generar ciertas imprecisiones (Hösel y Conn, 1982), dado que muchas cepas de levaduras exhiben alta actividad glicosidásica contra los sustratos sintéticos pero muestran baja actividad hacia los precursores glicosilados nativos. Por lo tanto, las enzimas deben ser evaluadas por su actividad hacia los sustratos naturales, los precursores glicosídicos (Fernández-González et al., 2003). Es decir que el uso de nitrofenil-glicósidos no provee información acerca de la especificidad de la enzima hacia los monoterpenos glicosilados que están presentes en el mosto de la uva. Se ha propuesto que la actividad de las  $\beta$ -glucosidasas hacia los glicósidos monoterpénicos está influenciada por la naturaleza de las agliconas (Gunata et al., 1988).

Ya sea porque se trata de una  $\beta$ -glucosidasa purificada o porque tiene menor especificidad por las agliconas terpénicas, la actividad  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* hacia los alcoholes monoterpénicos no fue preponderante siendo menor a la observada por las glicosidasas de *A. niger*. Sin embargo, a partir de estos resultados puede concluirse que la actividad y especificidad de la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* sobre los precursores glicosídicos del vino Moscatel es aglicona dependiente. Se observa un gran incremento en la concentración de vomifoliol y 3- $\alpha$ -oxo-ionol, por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* aislada de uvas, con relación al control y frente a la preparación comercial de glicosidasas, se observó una marcada diferencia en su actividad especialmente frente al glucósido de 3-oxo-

$\alpha$ -ionol (Tabla 5.1). Como consecuencia de ésto, dado el bajo umbral que presentan estos compuestos, el mismo vino tratado con la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* y con la preparación comercial, deberá tener marcadas diferencias en el perfil aromático como se discutirá a continuación. En este caso se pudo confirmar entonces que el perfil de glucósidos hidrolizados depende de la estructura de la aglicona.

### **Estudio sensorial del aroma del vino Moscatel tratado con los biocatalizadores inmovilizados.**

Dado que se observaron diferencias significativas en las concentraciones de los componentes volátiles liberados en el vino Moscatel luego del tratamiento enzimático con los biocatalizadores inmovilizados, era de gran interés estudiar los efectos producidos por estos tratamientos enzimáticos en el aroma del vino Moscatel. De todos modos es importante mencionar que los compuestos detectados en GC-MS no necesariamente son detectados por el sentido del olfato del ser humano, ya que se debe considerar el umbral de cada compuesto que se define en un medio determinado (agua, símil vino, vino, etc).

Mediante análisis sensorial se evalúa si existen diferencias entre el olor de vinos tratados con ambos biocatalizadores inmovilizados frente al vino testigo y en caso positivo se determinan los descriptores sensoriales de cada muestra.

Para ello, se realizó un test triangular ampliado con las tres muestras obtenidas luego del proceso de aromatización: vino testigo, vino incubado con glicosidasas-*A.niger*-Eupergit y vino incubado con  $\beta$ -Glu-*I.terricola* -Eupergit.

En una primera sesión, 10 jueces sensoriales evaluaron el vino testigo con respecto al vino tratado con glicosidasas-*A.niger*-Eupergit. En una segunda sesión, 14 jueces sensoriales evaluaron el vino testigo vs el vino tratado con  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit y en una tercera sesión, 10 jueces sensoriales evaluaron el vino tratado con glicosidasas-*A.niger*-Eupergit vs el vino tratado con  $\beta$ -Glu-*I.terricola* -Eupergit.

El procedimiento seguido por cada juez fue el siguiente:

- 1) oler las muestras de izquierda a derecha
- 2) seleccionar la muestra diferente y describirla

La boleta de evaluación utilizada se puede observar en la Figura 2 de Métodos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante tablas construidas a partir del test binomial. En la Tabla 5.2 se presentan los resultados obtenidos en el test triangular.

**Tabla 5.2 Resultado del test triangular de aromas, para vino Moscatel tratado con los derivados glicosidasas-*A.niger*-Eupergit y  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit.**

Muestras	Nº total de juicios	Nº de respuestas correctas	Nivel de significación
Testigo vs glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit	10	10	$p < 0.000$
Testigo vs $\beta$ -Glu- <i>I.terricola</i> -Eupergit	14	10	$p \leq 0.005$
Glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit vs $\beta$ -Glu- <i>I.terricola</i> -Eupergit	10	9	$P \leq 0.001$

Testigo: vino Moscatel con matriz (sin enzima)

Los resultados del test triangular evidencian que existen diferencias altamente significativas entre el aroma de los tres vinos evaluados.

Respecto a los descriptores de cada muestra, los evaluadores encontraron en el vino tratado con el derivado  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit, más aromas a dulce de fruta, miel y pasas cuando fue comparado frente al testigo y frente al glicosidasas-*A.niger*-Eupergit. En el vino resultante del tratamiento con el derivado glicosidasas-*A.niger*-Eupergit, se encontraron aromas más frutales y florales (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3 Descriptores encontrados por los evaluadores en el test triangular para las diferentes muestras en estudio.**

MUESTRA	DESCRIPTOR
Moscatel tratado con $\beta$ -Glu- <i>I.terricola</i> -Eupergit	Dulce de frutas, miel y pasas
Moscatel tratado con Glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit	Aromas frutales y florales

**Relación entre datos sensoriales y los instrumentales.**

Para estimar la posible contribución de los distintos compuestos volátiles analizados por GC-MS y el impacto sensorial de las muestras correspondientes a los tratamientos enzimáticos y vino testigo, utilizaremos el concepto de umbral de percepción. Para esto, se calcularon las unidades de aroma para los compuestos basados en los datos del umbral de percepción reportados en la bibliografía.

Debe recordarse que el aroma del vino está constituido por centenas de compuestos volátiles presentes en concentraciones que varían desde ng/L hasta mg/L. Además, el umbral de percepción de cada compuesto es muy diverso, lo que determina que el impacto en el aroma de los distintos compuestos volátiles dependa de las unidades de aroma, definidas como la relación entre la concentración de dicho compuesto (C) y su umbral (A).

$$\text{VAO (valores activos olfatorios)} = C/A$$

Esto indica que dependiendo de sus umbrales de percepción algunos compuestos que están presentes en un vino en muy bajas concentraciones (del orden de ng/L) podrían tener un gran impacto sobre el aroma, mientras que otros presentes en concentraciones mayores (del orden de mg/L) podrían no intervenir en las características sensoriales de la muestra (Ribereau-Gayon et al., 1998).

El cálculo del VAO permite establecer que los compuestos terpénicos liberados pueden determinar notorias diferencias sensoriales. En la Tabla 5.4 se muestran los umbrales de percepción y los VAO para dichos compuestos.

Tabla 5.4 Influencia del tratamiento enzimático del vino Moscatel con derivados glicosidasas-*A.niger*-Eupergit y  $\beta$ -Glu-*I.terrícola*-Eupergit. Umbrales de percepción y valores activos olfatorios (VAO).

Compuestos libres	Umbral percepción ( $\mu\text{g/l}$ )	Muestra ( $\mu\text{g/l}$ )			VAO			Descriptor
		Glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit	$\beta$ -Glu- <i>I.terrícola</i> -Eupergit	Control	Glicosidasas- <i>A.niger</i> -Eupergit	$\beta$ -Glu- <i>I.terrícola</i> -Eupergit	Control	
Geraniol	130	438	225	97	3,4	1,7	0,7	Frutado, floral
$\alpha$ -Terpineol	400	246	245	182	0,61	0,61	0,45	Floral, pino
Linalol	50	615	655	579	12,3	13,1	11,6	Floral, cítrico
Vomifoliol	Muy bajos	20,1	23	n.d				Frutas secas, pasas
3-oxo- $\alpha$ -ionol	Muy bajos	6,6	30	n.d				Miel, mermelada damascos

Los vinos tratados enzimáticamente presentaron incrementos notorios (25–50 veces) de la relación VAO en particular para el geraniol, superando ampliamente su umbral de detección, por lo que este compuesto alcanzó un impacto sensorial significativo. Sin embargo no se observan prácticamente cambios en los VAO para el  $\alpha$ -terpineol y el linalol. Para los óxidos del linalol y los norisoprenoides, (vomifoliol y 3-oxo- $\alpha$ -ionol), no fue posible encontrar dichos umbrales en bibliografía por lo que no se pudo determinar el VAO para estos compuestos. Sin embargo, considerando que estos compuestos poseen propiedades odorantes interesantes y bajos umbrales de detección, estos correlacionan muy bien con los descriptores sensoriales (dulce de fruta, miel y pasas) registrados para el vino tratado con el derivado  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit, lo que permite inferir que en este caso superaron sus umbrales de detección.

Por lo tanto, según los resultados obtenidos en este estudio, hay un importante incremento en la contribución de los terpenos y norisoprenoides en los vinos tratados enzimáticamente y particularmente la concentración de norisoprenoides fue mayor en aquellos tratados con el derivado  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit. Estos últimos compuestos son muy interesantes en vinos blancos jóvenes en donde podrían aportar cierta complejidad aromática, que no es la habitualmente encontrada en este tipo de vinos.

Para concluir, estos resultados preliminares son muy promisorios, en donde como se discutió anteriormente, se destaca la diferencia en especificidad que presenta la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* en relación a las glicosidasas comerciales estudiadas, que determinan propiedades sensoriales claramente diferentes en los vinos tratados con estas enzimas. Por esta razón, puede ser interesante continuar estos estudios con la evaluación de la actividad del derivado  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit sobre los precursores C13-norisoprenoides presentes en una variedad no aromática como el Tannat. En una variedad neutra como el Tannat, los norisoprenoides podrían tener un gran impacto sensorial en la producción de vinos de alta gama. En este caso habría que estudiar también el efecto de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en otros compuestos presentes como precursores glicosilados, tales como las antocianinas e investigar su efecto sobre el color del vino. Sería muy interesante a futuro purificar la  $\beta$ -glucosidasa de esta preparación comercial para poder compararla con la enzima de interés.

## **CONCLUSIONES**

---

Los vinos jóvenes presentan una elevada proporción de precursores aromáticos conjugados a glucosa como en los  $\beta$ -D-glucopiranosidos o conjugados a disacáridos más complejos, cuya liberación se da en forma incompleta mediante las glicosidasas endógenas durante la vinificación o muy lentamente por hidrólisis ácida durante el añejamiento. Este trabajo pretende contribuir al mejor conocimiento del potencial existente en  $\beta$ -glucosidasas de la flora autóctona y generar las bases del estudio de la posible utilización enológica de dichas  $\beta$ -glucosidasas.

Para esto se aislaron y caracterizaron las propiedades de las  $\beta$ -glucosidasas de las cepas de levaduras autóctonas que han sido seleccionadas como potencialmente interesantes para su uso enológico. Esto permitió el desarrollo de un biocatalizador inmovilizado de  $\beta$ -glucosidasa, con propiedades mejoradas de actividad y estabilidad, para evaluar su impacto sobre el perfil aromático de los vinos jóvenes. El uso del biocatalizador inmovilizado permite un mejor control del proceso de hidrólisis, siendo este aspecto de primordial importancia para el tratamiento de los vinos jóvenes. Su uso hace posible una liberación rápida y controlada de terpenos y norisoprenoides, lo que promueve el desarrollo de un aroma más complejo en corto tiempo favoreciendo una venta rápida del producto, pero conservando una fracción de aromas ligados como reserva aromática potencial, a ser liberado en el tiempo.

Como punto de partida de este trabajo para el aislamiento y caracterización de  $\beta$ -glucosidasas, se utilizó una colección de 60 cepas del grupo de Enología, de la Facultad de Química. Se seleccionaron tres cepas identificadas como: *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatschenkia terricola* y *Hanseniaspora uvarum*. De las tres cepas seleccionadas, la *Metschnikowia pulcherrima* fue la mejor productora de  $\beta$ -glucosidasa; la misma constituye una enzima interesante de la que no habían reportes anteriores. Se logró su purificación a homogeneidad y caracterización bioquímica, pero si bien fue activa frente a los glicósidos del vino, sus propiedades de estabilidad en las condiciones exigentes encontradas en vinos, dificultaron su

aplicación directa, aún después de la inmovilización. Las modificaciones del nano-ambiente con poliaminas- y polialdehídos-dextranos realizadas en el derivado inmovilizado hicieron posible una importante estabilización pero su actividad reducida se consideró insuficiente para uso enológico.

La  $\beta$ -glucosidasa de *Hanseniaspora uvarum* tiene la ventaja de presentar buena actividad a pH ácido, sin embargo la producción de la enzima por dicha cepa fue muy baja por lo que fue descartada en esta primer etapa.

La  $\beta$ -glucosidasa aislada de la fracción extracelular del cultivo de *Issatschenkia terricola* presentó interesantes propiedades desde el punto de vista de su estabilidad a pH ácido, tolerancia al etanol y actividad en presencia de glucosa en las concentraciones encontradas en vinos y jugos. Mediante el proceso de inmovilización covalente se logró concentrar eficientemente la actividad enzimática en el soporte acrílico utilizado presentando un notorio incremento en su estabilidad en símil vino a pH 3 y 4, lo que hizo posible desarrollar los estudios de aromatización en vino Moscatel. La actividad de la  $\beta$ -glucosidasa hacia los glicósidos monoterpénicos fue significativa pero el resultado potencialmente más interesante se relaciona con la especificidad de la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola*. En el estudio comparativo realizado junto con el derivado de glicosidasas comerciales, se advierte que ambos derivados inmovilizados presentan diferente especificidad sobre los precursores glicosídicos del vino Moscatel dependiendo de la aglicona. Con el derivado de *I. terricola* se obtuvo una concentración del norisoprenoide (3- $\alpha$ -oxo-ionol) notoriamente mayor en comparación al obtenido con el preparado de glicosidasas comerciales estudiado en iguales condiciones. Considerando los bajos umbrales de detección de estos compuestos y sus propiedades odorantes interesantes, esta diferente especificidad podría corresponderse con los resultados del análisis sensorial efectuado, ya que los expertos sensoriales que evaluaron los vinos tratados enzimáticamente encontraron que el vino tratado con el derivado  $\beta$ -Glu-*I.terricola*-Eupergit, presentó descriptores sensoriales que se relacionaban a dulce de fruta, miel y pasas, cuando fue comparado frente al vino testigo y frente al vino tratado con el derivado comercial Glicosidasas-*A. niger*-Eupergit.

Por lo tanto, a partir de la  $\beta$ -glucosidasa de *I. terricola* purificada se ha desarrollado un biocatalizador inmovilizado con propiedades muy promisorias. Su buena funcionalidad fue demostrada en un vino Moscatel joven, confiriéndole propiedades sensoriales claramente diferentes y aportando cierta complejidad aromática. Dicho biocatalizador inmovilizado muestra una estabilidad de almacenamiento muy buena y además, una vida media prometedora en condiciones enológicas (960 horas).

A su vez, se ha desarrollado un método sencillo para la preparación de un biocatalizador inmovilizado con múltiples actividades glicosidásicas ( $\beta$ -D-glucopiranosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidasa) presentando alta actividad expresada para las tres enzimas estudiadas y buena funcionalidad en las condiciones de los vinos. La excelente estabilidad obtenida durante el proceso de aromatización, reteniendo el 95 % de su actividad inicial, hace viable el reuso de este derivado inmovilizado con las ventajas que conlleva en una posible aplicación industrial.

Los resultados obtenidos en esta tesis justifican el planteo de una siguiente etapa de trabajo, que apunte a la realización de estudios a mayor escala por lo cual sería interesante aumentar la capacidad de producción de la enzima de *I. terricola*, mediante su clonación para mejorar su nivel de expresión. A su vez, para poder comprender mejor el proceso de hidrólisis así como los fundamentos de los resultados encontrados sería importante caracterizar dicha enzima desde el punto de vista cinético y estructural, incluyendo su secuencia.

Estos estudios se diseñaron con el objetivo de evaluar el potencial de la flora autóctona en cuanto al rol y posible aplicación de sus  $\beta$ -glucosidasas para el enriquecimiento del aroma de vinos jóvenes. Adicionalmente, también debería investigarse la utilización de las cepas seleccionadas, directamente durante la vinificación y así definir el proceso más conveniente desde el punto de vista biotecnológico.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Abbott, N., Coombe, B and Williams, P. (1991) The Contribution of Hydrolyzed Flavor. Precursors to Quality Differences in Shiraz Juice and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 3.
- Abian,O., Mateo,C., Fernández-Lorente,G., Palomo, J.M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2001). Stabilization of immobilized enzymes against water-soluble organic co-solvents and generation of hyper-hydrophilic micro-environments surrounding enzyme molecules. *Biocatal. Biotrans.* 19: 489-503.
- Amerine, M.A., Berg, H.W., Cruess, W.V. (1972) The technology of winemaking. The AVI Publishing Company, Inc., Connecticut.
- Aryan, A., Wilson, B., Strauss, C., Williams, P. (1987) The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their  $\beta$ -glucosidase activity with that of exogenous enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology. *Am J Enol Vitic.* 38:182-188.
- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Shewmaker, C. K. y Schuch, W. (2000) Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *Hort Science.* 35 (6): 1013-1022.
- Barbagallo, R., Spagna, G., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2004) Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme Microb Technol.* 35: 58-66.
- Barbagallo, R.N., Spagna, G., Palmeri, R., Torriani, S. (2004) Assessment of  $\beta$ -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 34:292-6.
- Baumes, R., Wirth,J., Bureau,S., Günata, Y., Razungles, A. (2002) Biogeneration of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Analytica CHIMICA Acta.*458, 3-14.
- Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., Günata, Z. Arômes. (1998) *In Oenologie*, fondements scientifiques et technologiques; C. Flanzky, Ed., Tec & Doc: Paris, 1311.
- Bayonove, C., Gunata Z., Cordonnier, R. (1984) Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arome du jus de Muscat avant fermentation: production de terpenols. *Bull OIV.* 643, 741-758.
- Bayonove, C., Gunata, Y., Sapis, J., Baumes, R., Dugelay, I., Grassin, C. (1993). L'aumento degli aromi nel vino mediante l'uso degli enzimi. *Vignevini.* 9, 33-36.
- Belancic A, Gunata A, Vallier M. J, Agosin E. (2003)  $\beta$ -Glucosidase from the Grape Native Yeast *Debaryomyces vanriijiae*: Purification, Characterization, and Its Effect on Monoterpene Content of a Muscat Grape Juice. *J Agric Food Chem.* 51:1453-1459.

Bhatia, Y., Mishra, S. and Bisaria, V. (2002) Microbial  $\beta$ -glucosidase: cloning, properties and applications. *Crit Rev. Biotechnol.* 22, 375-407.

Boido, E. (2002) Modificaciones producidas por la fermentación maloláctica en la fracción aromática de los vinos Tannat. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Montevideo, UdelaR. Doctor en Química, 294.

Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. (2002) Effect of  $\beta$ -glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavour precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 50:2344-9.

Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., Dellacasa, E. (2003) Aroma composition of *Vitis vinífera* cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 5408-5413.

Boller, T., Meier, C., Menzler, S. (2002) EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis. *Organic Process Research & Development*, 6, 509-519

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.

Brena, B.M. (1996) PhD thesis: Reversible immobilization of enzymes using agarose-bound group-specific ligands. *Acta Universitatis Uppsaliensis*, Uppsala University, Sweden.

Brena, B.M., Batista-Viera, F. (2006) "Immobilization of enzymes: a literature survey" En Immobilization of enzymes and cells. Guisán, J.M., ED. 2<sup>da</sup> edición, pag 15. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.

Cabaroglu, T., Selli, S., Canbas, A., Lepoutre, J. P., Günata, Z. (2003). Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. *Enz. Microb. Technol.* (33): 581-587.

Calleri, E., Massolini, G., Lubda, D., Temporini, C., Loiodice, F., Caccialanza, G. (2004) Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization. *Chromatogr. A* 1031, 93-100

Cao, L. (2005). Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Op. Chem. Biol.* 9: 217-226.

Carlsson, J., Janson, J.C, Sparrman, M. (1998) Affinity Chromatography. En Protein Purification, 2<sup>da</sup> Ed, Janson, J.C, y Rydén L, ED. Wiley-Liss, NY.

Catania, C., Avagnina, S. (2007). Los estímulos odorantes del vino. Curso Superior de degustación de vinos. EEAMendoza, INTA.

Carrau, F., Medina, K., Boide, E., Fariña, L., Gaggero, C., Dellacasa, E., Versini, G., Henschke, P. (2005) De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 107-115.

- Cordero Otero, R., Ubeda, I., Briones-Perez, N., Potgieter, N., Villena, M., Pretorius, I., Van Rensburg, P. (2003) Characterization of the  $\beta$ -Glucosidase activity produced by enological strains of non-*Saccharomyces yeast*. *J. Food Science*. 68 (8)
- Cordonnier, R., and Bayonove, C.L. (1974). Mise en evidence dans la baie de raisin, var. Muscat d'Alexandrie, de monoterpenes lies revelables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C.R. Acad. Sci. Paris (Serie D)* 278: 3387-3390.
- Cordonnier, R., Gunata, Y. Z., Baumes, R. and Bayonove, C. (1986) Données récentes sur les précurseurs d'arôme du raisin, perspectives de leur exploitation en vinification. *Revue Française d'Oenologie*. 102 29-41.
- Cordonnier, R.E., Gunata, Z., Baumes, R.L., Bayonove, C.L. (1989) Recherche d'un materiel enzymatique adapté `a l'hydrolyse des precurseurs d'arome de nature glycosidique du raisin. *Connaiss Vigne Vin*. 23:7-23.
- Delahunty, C., Eyres G., and Dufour, P. (2006) Gas chromatography-olfatometry. *J. Sep. Sci.* 29; 2107-2125.
- Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J., Salmon, J., Bayonove, C. (1994) Glycosidases activities of three enological yeast strains during winemaking: effect of the terpenol content of muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 45:291-295.
- Dimitriadis, E., Williams, P.J. (1984). The development and use of a rapid analytical technique for estimation of free and potentially volatile monoterpenes flavorants of grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 66-71.
- Drider, D., Pommares, P., Chemardin, P., Arnaud, A., Galzy, P. (1993) Purification and properties of the endocellular  $\beta$ -glucosidase of *Candida cacaoui* Buckley and Van Uden CBS 2020. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 473-479
- Dubourdieu, D., Darriet, P., Ollivier, C., Boidron, J.N., Ribéreau-Gayon, P. (1988) Rôle de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans l'hydrolise enzymatique des hétérosides terpéniques du jus de raisin. *Compts Rendus de l'Academie des Sciences Paris* 306:489-493
- Eberhart, B., Cross, D., Chase, L. (1964) B-glucosidase system of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 87, 761-770.
- Egli, C.M., Ediger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effects on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779-789.
- Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M., Bacher, A. (1997). Monoterpenoid essential oils are not of mevalonate origin. *Tetrahedron Letter*. 38, 3889-3892.
- Elber, S.E. Analytical Chemistry: Unlocking the secrets of wine flavour. *Food Rev. Int.* 17, 45-64, 2001.
- Enzell, C. (1981) Influence of curing on the formation of tobacco flavour. *Flavour'81*. Schreier. Berlin, Walter de Gruyter: 449-478.

Enzell, C. Biodegradation of carotenoids. (1985) An important route to aroma compounds. *Pure Appl. Chem.* 57 (5): 693-700.

Erzheng, S., Tao, X., Liping, G., Qianying, D., Zhengzhu, Z. (2010). Immobilization of  $\beta$ -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food and bioproducts processing.* 88 ( 2-3), 83-89.

Escudero, A., Cacho, J., Ferreira, V. (2000). Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology.* 211, 105-110.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., and Querol, A. (1998) The role of non *Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Int. Microbiol.* 1:143-148

Etievant, P.X. (1991). "Volatile compounds in food and beverages" New York, USA, Dekker.

Fernández, M., Ubeda, J., Briones, A. (2000) Typing of non-*Saccharomyces* yeast with enzymatic activities. *Int J. Food Microbiol.* 59, 29-36.

Fernández-González, M.; Di Stefano, R.; Briones, Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. *Food Microbiol* 2003, 20, 35-41.

Fernandez-Lafuente, R., Cowan, D.A., Wood, A.N. (1995) Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enz. Microb. Technol.* 17, 366-72.

Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C. M., Caanan-Haden, L., Rodes, L., Guisan, J. M. (1999) Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilizes derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. *Enz Microb. Technol.* 24 96-103.

Ferreira, V., Lopez, R., Escudero, A., Cacho, J.F. (1998). The aroma of Grenache red wine: hierarchy and nature of its main odorants. *J. Sci. Food Agric.* 77, 259-267.

Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., Cacho, J. (2002). Chemical characterization of the aroma of grenache rose wines. Aroma Extract Dilution Analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4048-4054.

Fisher, C., Scott, T. R. (2000). Flavores de los alimentos. Biología y química. *ACRIBIA*, Zaragoza.

Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavor (review article). *Int. J. Food. Microbiol.* 86, 11-22.

Gallifuoco, A., Alfani, F., Cantarella, M., Spagna, G., Pifferi, P.G. (1999) Immobilized  $\beta$ -glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. *Proc. Biochem.* 35: 179-185.

- Gallifuoco, A., D'Ercole, F., Alfani, M., Cantarella, G., Spagna G., and Pifferi, P. G. (1998). On the use of chitosan-immobilized  $\beta$ -glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition. *Proc. Biochem.* 33 (2), 163-168.
- Gemeiner, P. (1992). Materials for enzyme engineering, in *Enzyme Engineering* (Gemeiner, P., Ed.) Ellis Horwood, New York, pp. 13-119.
- Gist Brocades. (2000) *Guide Enzyme*, Capítulo 6, pag 1.
- Gonde, P., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P. (1985) Purification and properties of an exocellular  $\beta$ -glucosidase of *Candida molischiana* (Zikes) Meyer Yarrow capable of hydrolyzing soluble cellodextrins. *J. Biochem. Cell Biol.* 63:1160-6.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2010). A novel extracellular beta-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Proc. Biochem. In Press.* Disponible on line: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>.
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2008) One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol Lett.* 30:1469-1475
- Gonzalez-Viñas, M., Perez-Coello M., Cabezudo D. (1998) Sensory analysis of aroma attributes of Young airen White wines during storage in the bottle. *J. Food Quality.* 21:285-297.
- Grimaldi, A., McLean, H., Jiranek, V. (2000) Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am. J Enol. Vitic.* 51:362-9.
- Grossman, C., Rapp, A., Rieth, W. (1987) Enzymatische Freisetzung gebundener aromastoffe in Wien. *Deutsche Lebensmittel Rundschau.* 83:7-12
- Guegen, Y.; Chemardin, P., Janbon, G., Arnaud, A., and Galzy, P. (1996) A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 44 (8), 2336-2340
- Guegen, Y., Chemardin, A., Arnaud, A., Galzy, P. (1995) Comparative study of extracellular and intracellular  $\beta$ -glucosidase of a new strain of *Zygosaccharomyces bailii* isolated from fermenting agave juice. *J. Appl. Bacteriol.* 78:270-280
- Guegen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A., Galzy, P. (2008) Comparative study of extracellular and intracellular  $\beta$ -glucosidases of a new strain of *Zygosaccharomyces bailii* isolated from fermenting agave juice. *J Appl Microbiol.* 78 (3): 270-280.
- Guegen, Y., Chemardin, P., Pien, S., Arnaud, A., Galzy, P. (1997). Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized  $\beta$ -glucosidase. *J. Biotechnol.* 55(3), 151-156.
- Guisán, J., Batisda, A., Blanco, R., Fernandez-Lafuente, R., García-Junceda, E. (1997). "Immobilization of enzymes on glyoxyl agarose. Strategies for enzyme stabilization

by multipoint attachment". En Immobilization of Enzymes and Cells. Bickerstaff, G., ED. vol 1, pag 277-287. The Humana Press Enc., Totowa, N.J.Totowa.

Guisán, J.M., Rodríguez, V., Rosell, C.M., Soler, G., Bastida, A., Blanco, R.M., Fernández-Lafuente, R., García-Junceda, E. (1997). "Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polifunctional macromolecules". En Immobilization of enzymes and cells. Bickerstaff G., ED. p. 289. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.

Guisán, J.M, Penzol, G., Armisen, P., Bastida, A., Blanco, R., Fernandez-Lafuente, R., García-Junceda, E. (1997) "Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates". En Immobilization of enzymes and cells. Bickerstaff, G., ED. vol 1, pag 261-275. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Guisán, J.M. (2006) "Immobilization of enzymes as the 21st century begins: an already solved problem or still an exciting challenge?". En Immobilization of enzymes and cells. Guisán, J.M., ED. 2<sup>da</sup> edición, pag 1. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.

Gunata, Y. Z., Bitteur, S., Brillouet, J.M., Bayonove, C., Cordonnier, R. (1988) Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr. Res.* 184 139-149.

Gunata, Y. Z., Bayonove, C., Cordonnier, R.E., Arnaud, A. and Galzy, P. (1990b) Hydrolysis of grape monoterpenyl- $\beta$ -D-glucosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidases. *J. Sci Food Agric.* 50 499-506.

Gunata, Y. Z., Bayonove, C., Tapiro, C., Cordonnier, R. (1990a) Hydrolysis of grape monoterpenyl- $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -D-glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1232-1236.

Gunata, Y., Bayonove, C., Baumes, R., and Cordonnier R. (1986) Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing: preliminary results. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 112-114.

Gunata, Z., Bayonove, R., Baumes, R., Cordonnier, R. (1985). The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* 331:83-90.

Gunata, Z., Dugelay, I., Sapis, J., Baumes, R., Bayonove, C. (1993) "Role of enzymes in the use of the flavor potential from grape glycosides in winemaking". En Progress in Flavor Precursor Studies. P. Schreier and P. Winterhalter ED. p. 219-234. Allured Publishing Co. Carol Stream.

Gunata, Z., Dugelay, I., Sapis, J.C., Baumes, R., Bayonove, C. (1990) Action des glycosidases exogenes au cours de la vinification: Liberation de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. I Sci. Vigne Vin.* 24:133-144

Gunata, Z., Dugelay, J., Sapis, J.C., Baumes, R., Bayonove, C. (1993) "Role of enzymes in the use of the flavor potential from grape glycosides in winemaking" En Progress in Flavour Precursor studies. Schreier, P and Winterhalter, P, ED. Allured Publishing Co., Carol Stream.

Gunata, Y., Bayonove, C., Baumes, R., Cordonnier, R. (1985a) The aroma of grapes, II. The localization and evolution of free and bound fractions of some grape aroma

- components c.v. Muscat during first development and maturation. *J Sci Food Agric.* 36: 857-862.
- Gupta, M., Mattiasson, B. (1992). "Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems". En *Methods of Biochemical Analysis*. Suelter, C.H., ED. Vol. 36 pp.1-34. Wiley, New York,
- Guth, H. (1997). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3022-3026.
- Hartmeier, W. (1988). *Immobilized biocatalysts*, Springer-Verlag, Berlin.
- Heard, G. (1999). Novel yeast in winemaking-looking to the future. *Foods Aus.* 51, 347-352.
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P. (1998) Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84, 865-876.
- Hernández, L., Espinosa, J., Fernández-González, Briones, M. (2003)  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 171-176.
- Heyman H., Noble, A.C., Boulton R.B. (1986). Analysis of methoxy pyrazines in wines. I. Development of a quantitative procedure. *J. Agric. Food Chem.* 34, 268-271.
- Hösel, W., Conn, E.E. (1982) The aglycone specificity of plant  $\beta$ -glycosidases. *Trends Biochem. Sci.* 7, 219-221.
- Illanes, A. (1994) *Biología de enzimas*. Monografía N° 35 de la OEA, Ediciones Universitarias de la Universidad de Valparaíso.
- Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2007). Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents. *J. Mol. Catal. Enzym.* :B. 46 , 43-51.
- Irazoqui, G., Villarino, A., Batista-Viera, F., Brena, B. (2002) Generating favorable nano-environments for thermal and solvent stabilization of immobilized  $\beta$ -galactosidase. *Biotechnol. Bioeng.* 77: 430-434.
- ISO 3591. (1977). *Sensory Analysis Apparatus: Wine-tasting Glass*. *International Standards Organization (ISO)*, Geneva, Switzerland.
- IST "Method development in solid phase extraction using ISOLUTE ENV+ SPE columns for the extraction of aqueous samples" (2001), *International Sorbent Technology*
- Jackson, R. (1994) *Wine Science-principles, practice, perception*. Academic Press, San Diego.
- Janbon, G., Derancourt, J., Chermardin, P., Aranuld, A., and Galzy, P. (1995) A very stable  $\beta$ -glucosidase from a *Candida molischiana* mutant strain: enzymatic properties, sequencing, and homology with other yeast  $\beta$ -glucosidases. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1320-1322.

Jolly, N., Augustyn, O., Pretorius, S. (2006) The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic*; 27: 15-39.

Karagulyan, V., Gasparyan, S. (2008). Decker Immobilization of Fungal  $\beta$ -Glucosidase on Silica Gel and Kaolin Carriers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146, 39-47.

Katchalski-Katzir, E., (1993) Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *Tib. Tech.* 11, 471-478.

Katchalski-Katzir, E., Kraemer, D. (2000). Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10,157-176.

Klibanov, A.M. (1983) "Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation". En *Advances in Applied Microbiology* (29), Academic Press, Inc., p. 1-28

Kotseridis, Y., Baumes, R. (2000). Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *J. Agric. Food Chem.* 48, 400-406.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000).Yeast and its importance to wine aroma: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 97-129.

Lasch, J., Janowski, F. (1988) Leakage stability of ligand-support conjugates under operational conditions. *Enz. Microb. Technol.* 10, 312-314.

Lawless, H., Heymann, H. (1998) *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices.* New York, Chapman and Hall.

Lecas, M., Gunata, Z., Sapis, J., Bayonove, C. (1991) Purification and partial characterization of  $\beta$ -glucosidase from grape. *Phytochem.* 30: 451-454

Leclerc, M., Gonde, P., Arnaud, A., Ratomahenina, R., Galzy, P. (1984) The enzyme system in a strain of *Candida wickerhamii* Meyer and Yarrow participating in the hydrolysis of cellodextrins. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 330:509-21.

Lichtenthaler, H., Rohmer, M., Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 101, 643-652.

LLorca I, Noguera, O. (2002). Enfermedad de Gaucher: a propósito de un caso. *Rev Diagn. Biol.* 51,3. Madrid.

López, R., Ferreira, V., Hernández, P., Cacho, J.F. (1999). Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1461-1467.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265-75.

Marais, J. (1983) Terpenes in the aroma of grapes and wines: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 4, 49-60.

Marin, A., Barnard, J., Darlington, B., Acree, T. (1991) Sensory thresholds: estimation from dose-response curves. *J. Sens. Stud.* 6 (4): 205-225.

- Martinek, K., Mozhaev, V.V. (1985) "Immobilization of enzymes: an approach to fundamentals studies in biochemistry". *Advances in Enzymology and Related Areas of molecular biology*, 57, 179-249.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J., Tam, A., Daminati, M. (2002). Epoxy-Sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Progr.* 18: 629-634.
- Mateo, J., Jimenez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wine. *J. Chromatograp. A* 881, 557-567.
- Mateo,C., Abian,O., Fernández-Lorente, G., Pessela, B., Grazu, V., Guisan,J.M., Fernandez-Lafuente, R. (2006) "Immobilization-Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups". En *Immobilization of Enzymes and Cells*. Bickerstaff, G., ED. *Methods Biotechnol*, vol 22, pag 47-55. The Humana Press Enc., Totowa, N.J. Vol
- Mateo,C., Grazú, V., Pessela,B.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. (2007) *Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization*. *Biochemical Society Transactions Volume 35*, part 6.
- Matsui, .I, Sakai, Y., Matsui, E., Kikuchi, H., Kawarabayasi, Y., Honda, K. (2000) Novel substrate specificity of a membrane-bound- $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horijoshii*. *FEBS Lett.* 467 195-200.
- Messing, R.A. (1975). *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*. Academic Press Inc, New York.
- Monsan, P., Combes, D. (1988) *Enzyme stabilization by immobilization"* en *Methods in Enzimology*. K. Mosbach ED.137, 584. Academic Press, New York.
- Murrey, K. E., Whitfield, F.B. (1975). The occurrence of 3-alkyl-2 methoxypyrazines in new vegetables. *J. Sci. Food. Agric.* 26, 973-986.
- Nicolini, G., Gunata, Y., Versini, G., Dugelay, I., and Mattivi, F. (1994) Use of glycosidase enzyme in must: Effect on the chemical and sensory characters of the wines. In *Connaissance aromatique des cepages et qualite des vins*. Actes d Symposium International; *revue Francaise d'Oenologie*. 00 257-266. Montpellier,
- Palmeri, R., Spagna, G. (2007). Beta-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enz. Microb. Technol.* 40(3), 382-389.
- Perez-Coello, M. S., Martín-Álvarez, P.J., Cabezudo M. D. (1999) Prediction of the storage time in bottles of Spanish white wines using multivariate statistical analysis. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 208, 408-412.
- Pogorzelski, E., Wilkowska, A. (2007). Flavour enhancement through the enzymatic hydrolysis of glycosidic aroma precursors in juices and wine beverages: a review. *Flavour Fragr. J.* 22, 251-254.

- Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine arôme. *Experientia* 42, 873-884.
- Riberaeau-Gayon, P., Boidron, J., Terrier, A. (1975) Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* 23, 1042-1047.
- Riberaeau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (1998) *Traité d'oenologia 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements. Vol 2, 1<sup>a</sup> ed, Dunod, Paris.*
- Riccio, P., Rossano, R., Vinella, M., Domizio, P., Zito, F., Sansevrino, F., D'Elia, A., Rosi, I. (1999) Extraction and immobilization in one step of two  $\beta$ -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. *Enz. Microb. Technol.* 24, 123-129.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., Sahm, H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Ann. Chem. Soc.* 118, 2564-2566.
- Rosi, I., Villena, M., Domizio, P. (1994) Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeast of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77:519-527
- Saha, B.C., Bothast, R.J. (1996) Glucose tolerant and thermophilic  $\beta$ -glucosidases from yeasts. *Biotechnol. Lett.* 18:155-158.
- Sancho, J., Bota, E., de Castro, J.J. (1999) *Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Edicions Universitat. Barcelona. España.*
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., Martínez-Ripoll, M., Lequerica, J.L., Polaina, J. (1998) Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J. Mol. Biol.* 23; 275(3):491-502.
- Schreier, P. (1984) *Metabolites from Higher Terpene Precursors.* New-York, Bertsch W., Jennings W.G., Keiser R.E.
- Schwender, J., Zeidler, J., Gröner, R., Müller, C., Focke, M., Braun, S., Lichtenthaler, F.W., Lichtenthaler, H.K. (1997). Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414, 129-34.
- Scouten, W. H. (1987) "A Survey of Enzyme Coupling Techniques". En *Methods in Enzymology* Mosbach, K., ED. Vol. 135 , pp. 30-65. Academic, London.
- Sefton, M., Francis, L., Williams, P. (1993) The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavor precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 359-370.
- Sefton, M., Williams, P. (1991) Generation of oxidation artifacts during the hydrolysis of norisoprenoid glycosides by fungal enzyme preparations *J. Agric. Food Chem.* 39 (11), pp 1994-1997.
- Shoseyov, O., Ami Bravdo, B., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L., Ikan, R. (1990). Immobilized Endo- $\beta$ -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *J Agric Food Chem.* 38, 1387-1390.
- Soden, A., Francis, I., Oakey, H., Henschke, P. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21-30.

- Spagna, G., Barbagallo, R., Greco, E., Manenti, I., Pifferi, G. (2002) A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. *Enz. Microb. Technol.* 30:80-89.
- Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. (2002) Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. *Enz. Microb. Technol.* 31:1036-41.
- Spagna, G., Romagnoli, D., Martino, A., Bianchi, G., Pifferi, P.G. (1998) A simple method for purifying glycosidases:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma wine. Part 1. *Enz. Microb. Technol.* 22:298-304.
- Spurgeon, S., Porter, W. (1981) Biosynthesis of Isoprenoids Compounds. J. W. Porter and S. L. Spurgeon ED. Vol. 1, pp. 1-46. Wiley, New York.
- Strauss, R., Wilson, B., Gooley, P., Williams, P. (1986). "Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor". En Biogeneration of Aromas. T.H. Parliament and R. Croteau, EDS. *American Chemical Society*, Chapter 18, pp 222-242.
- Swaigood, H. E. (1991) "Immobilized enzymes: Application to bioprocessing of food". En *Food Enzymol*, Fox, P.F. ED. pp. 309-341. Elsevier Applied Science, New York.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, P.A., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11: 139-173.
- Tanaka, A., Kawamoto, T. Industrial application of immobilized Biocatalysts, Marcel Dekker, New York (1991).
- Tanriseven, A., Aslan, Y. (2005) Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enz Microb Technol.* 36:550-554.
- Taylor, R.F. (1991). Protein Immobilization. Fundamentals and Applications. Taylor,R.F.,ED. Marcel Dekker, New York.
- Trean, M. (1980) "Effect of Immobilization on Enzyme Activity". En Immobilized Enzymes. An Introduction and Applications in Biotechnology. pp. 11-56. Wiley, Chichester-New York,
- Tu, M., Zhang, X., Kurabi, A., Gilkes, N., Mabee, W. (2006) Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 28: 151-156.
- Turan, Y., Zheng, M. (2005) Purification and Characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem (Moscow)*. 70 (12): 1363-1368.
- Ugliano, M., Bartowsky, E.J., Mc Carthy, J., Moio, L., Henschke, P.A. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6322-6331.
- Umezurike, G.M. (1975) The subunit structure of beta-glucosidase from *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Biochem J.* 145(2): 361-368.

- Van Rooyen, R., Hahn-Hägerdal, B., La Grange, D.C., van Zyl, W.H. (2005). Construction of cellobiose-growing and fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Biotechnol.* 120, 284-295.
- Vasserot, Y., Arnaud, A., Galzy, P. (1995). Monoterpenol Glycosides in Plants and their Biotechnological Transformation. *Acta Biotechnol.* 15 1, 77-95 Akademik Verlag.
- Vasserot, Y., Christiaens, H., Chemardin, P., Arnaud, A., Galzy, P. (1989) Purification and properties of a  $\beta$ -glucosidase of *Hanseniaspora vineae* van de Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. *J. Appl. Bacteriol.* 66:271-279.
- Versini, G., Carlin, S., Nicolini, G., Dellacassa, E., Carrau, F. (1999). Updating of varietal aroma components in wines. In: Proceed. VII Latin Congress Enol. Vitic. Mendoza, Argentina. 325-349.
- Versini, G., Rapp, A., Sera, A., Pichler, U., Ramponi, M. (1994). Methyl trans geranate and farnesoate as markers for Gewürztraminer grape skins and related distillates. *Vitis.* 33, (3), 139-142.
- Villena, M., Úbeda, J., Briones, I. (2007)  $\beta$ -Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. *Enz. Microb. Technol.* 40 420-425.
- Voirin, S. (1990). Connaissance de l'arôme du raisin: analyses et synthèses de précurseurs hétérosidiques. Ph.D. Thesis, Université des Sciences et Techniques, Montpellier II.
- Voirin, S. G., Baumes, R. L., Gunata, Z. Y., Bittéur, S. M., Bayanove, C. L. (1992a). Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine I. XAD-2 extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic glycosides. *J. Chromat.*, 590, 313-328.
- Voirin, S. G., Baumes, R. L., Sapis, J. C., Bayanove, C. L. (1992b). Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J Chromat.* 595, 269-281.
- Weetall, H.H. (1980) "Immobilized proteases-potential application". En Immobilized enzymes for food processing. H. Pitcher, CRC Press, Boca Raton, Florida, 175-183.
- White, C. A., Kennedy, J. F. (1980) Popular matrices for enzyme and other immobilizations. *Enz. Microb. Technol.* 2: 82-90.
- Williams, P., Cynkar, W., Francis, L., Gray, J., Iland, P., Coombe, B. (1995) Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose. *J. Agric. Food Chem;* 43: 121-128.
- Williams, P., Sefton, M., Francis, L. (1992). "Glycosidic Precursors of Varietal Grape and Wine Flavor". En Flavor Precursors: thermal and enzymatic conversions. *Am Chem Soc. ACS Symposium Series*, Vol. 490, pp 74-86. Teranishi R, Takeoka G and Guntert, EDS.
- Williams, P.J. (1993) "Hydrolytic flavor release release in fruit and wines through hydrolysis of non-volatile precursors". En Flavor Science- Sensible Principles and Techniques. *Am. Chem. Soc.* Acree, T.E., Teranishi, R., EDS. p 287. Washington DC.

Williams, P., Strauss, C., Wilson, B. (1982) Use of C 18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and norisoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromat.* 235, 471-480.

Wilson, B., Strauss, R and Williams, P. (1986) The distribution of free and glycosidally-bound monoterpenes among skin, juice and pulp fractions of some white grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 107-111

Yanai, T., Sato, M. (1999) Isolation and Properties of  $\beta$ -Glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 50: 231-235.



## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS**

- 1- González-Pombo, P., Pérez , G., Carrau, F., Guisán, J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2008) One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. ***Biotechnology Letters***. **30:1469–1475**. (Ver carpeta adjunta)
  
- 2- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2010). A novel extracellular beta-glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. ***Process Biochemistry***. Trabajo aceptado para publicación el 23-JUL-2010, disponible on line:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.016>. **In Press**.
  
- 3- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2010). Co-immobilization of multiple glycosidase activities from a commercial preparation for aroma enhancement of wines. Manuscrito a ser sometido para su publicación.

## Co-immobilization of multiple glycosidase activities from a commercial preparation for aroma enhancement of wines.

### ABSTRACT

This work aimed at the development of a simple method for the co-immobilization of glycosidases ( $\beta$ -D-glucopyranosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase) present in a commercial preparation from *Aspergillus niger* which is commonly used in soluble form in the wine industry. The influence of the most relevant variables (reaction time, pH, salt concentration, and protein: support ratio) in the immobilization process onto acrylic beads were studied and optimized. The optimal immobilization efficiency achieved was about 90% for the three enzymes when the coupling reaction was performed at pH 7.0 in 1M sodium phosphate during 4 days incubation period. After enzymatic treatment of Muscat wine, gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) analysis indicated a significant increase in monoterpenes and norisoprenoids showing the potential of the immobilized enzymes for aroma enhancement. The co-immobilized glycosidases derivative was found to be very stable within the wine environment, preserving 95% of residual activity after 20 days at room temperature.

Noteworthy, the use of the immobilized biocatalyst makes possible to control the hydrolysis process to the desired degree, and stop it by simple filtration. Since the potential for industrial application is considerable, the study should be scaled up to a pilot study in the wine industry.

### INTRODUCTION

Monoterpenols of grapes, which are linked to di-glycosides, constitute a significant reservoir of aromatic precursors of wine. These conjugate compounds are not volatile and are generally soluble in water. Thus, the enzymatic hydrolysis of these glycosidically bound compounds has attracted much interest with respect to the enhancement of wine flavor. The sequential mechanism of enzymatic hydrolysis is now well established: in the first step, the glycosidic linkage is cleaved by either an  $\alpha$ -arabinofuranosidase (Ara), an  $\alpha$ -rhamnosidase (Rha), or an  $\beta$ -apiofuranosidase (Apio), and then a  $\beta$ -glucosidase (BG) liberates the monoterpenols. Thus, glycosidases from grapes, filamentous fungi and yeasts have been the subject of an extensive research for their possible involvement in the hydrolysis of glycosidic flavor precursors. The enzymes from *Aspergillus niger* and some yeast species have been found to possess interesting properties for practical uses in winemaking (Günata et al. 1990; Günata et al. 1993). These *Aspergillus niger* commercial enzyme preparations are largely used in the soluble form since 1970s in fruit processing and winemaking to improve juice clarification, juice yield and color extraction. These preparations contain multiple glycosidase activities which are involved in the hydrolysis of glycosides such as  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -arabinosidase and  $\alpha$ -ramnosidase (Palmeri and Spagna, 2007). However, the use of soluble commercial preparations is troublesome because it is extremely difficult to control the extent of the hydrolysis reaction which is very important in enology.

Enzyme immobilization on an inert carrier offers many advantages for industrial processes including the development of continuous processes with a considerable cost saving as well as a better control of the enzymatic reaction. The latter is of paramount importance for the treatment of young wines, to allow a rapid and controlled liberation of terpenes, which favors a quick sale, while preserving a fraction of bound aromas as a reserve, to be released with time. We have focused in the development of a simple method for the immobilization of multiple glycosidase activities from a commercial preparation widely used by the wine industry in soluble form, onto an epoxy-activated acrylic support. Our main goal was to envisage the potential use of the obtained co-immobilized glycosidases for flavour enrichment of a white Muscat wine.

So, we have examined the use of epoxy-activated acrylic beads (Eupergit C) to immobilize glycosidases from *A. niger*. We have chosen Eupergit C as a support because it has been identified as one of the most useful carriers for covalent immobilization of enzymes for industrial applications in food industry and because of its ability to stabilize protein conformation by multi-point attachment (Katchalsky-Katzir, 2000; Mateo et al. 2007).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The glycosidases ( $\beta$ -D-glucopyranosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -L-ramnopyranosidase, from *Aspergillus niger*, are contained in the commercial preparation Cytolase PCL5 (DSM Food Specialties, MA Delft, Netherlands). The synthetic glycosides used as substrates were: *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG), *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside (*p*NPA), and *p*-nitrophenyl - $\alpha$ -L-ramnopyranoside (*p*NPR) and they were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The bicinchoninic acid (BCA) reagent was purchased from Pierce (Rockford, Ill.). The glucose determination kit was purchased from REACUR (Montevideo, Uruguay). EUPERGIT C was kindly donated by Röhm Pharma (Darmstadt, Germany). The C18 reverse phase column (Sep-Pak<sup>®</sup> cartridge) was supplied by Waters TM (USA) and the ISOLUTE<sup>®</sup> ENV+ was purchased from IST Ltd. (Mid Glamorgan, U.K). All other chemicals used were of reagent grade.

### Methods

#### Enzyme assays

Glycosidases were assayed using *p*-nitrophenyl (*p*NP) glycosides. Depending on whether the enzyme was soluble or immobilized, 10  $\mu$ l of a solution or suspension of enzyme were added at 1.25 mL of a solution of 5.5 mM of *p*NPG, 1.5 mM of *p*NPA or 1.5 mM *p*NPR dissolved in 0,1M acetate buffer at pH 4.5 (activity buffer) at 23°C. The assay was performed for 5-10 min after which 1.25 mL of 0.2 M carbonate buffer, pH 10 was added to stop the reaction and the liberated *p*-nitrophenol was determined by measuring the absorbance at 400nm. The molar extinction coefficient used was 18,300 mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

We defined one unit of enzyme activity (EU) as that which releases 1  $\mu$ mol *p*-nitrophenol/min under the specified enzyme assay conditions.

Proteins were assayed according to the procedure of the bicinchoninic acid (BCA) (Smith et al, 1985)

#### Immobilization procedure

Immobilization of glycosidases was carried out by reaction of 1 g suction dried Eupergit C with Cytolase PCL 5 (5 mL solution) in 1 M sodium phosphate pH 7.0 at 23 °C with shaking for 96 h. The biocatalyst was then filtered, washed with distilled water and 1 M sodium phosphate buffer pH 7.0. The excess of

epoxide groups on the derivative was blocked by incubation with glycine 3M for overnight at 6°C. The immobilized biocatalyst was stored at 4°C in activity buffer.

#### **Leakage test**

The immobilized biocatalyst (100 mg filter-dry gel) was incubated with 1,0 mL of 25 mM sodium phosphate pH 7.0 at 23°C shaking for 2 hours. The immobilized derivative was separated by filtration and then incubated with 1,0 mL of 30% ethylenglicol in 50 mM sodium phosphate pH 7.0 at 23°C for 2 hours. The released enzyme activities were determined in the corresponding solutions after filtration.

#### **Optimization of immobilization procedure**

Optimum conditions for immobilization were determined by individually changing some critical parameters: incubation time for coupling (in the range 1 to 7 days); pH (5.0 to 9.0); buffer salt concentration (0.5 to 1.4 M sodium phosphate), and protein: support ratio in the immobilization processes (35 -145 mg protein/g suction dried gel).

The effect of pH on the activity of native and immobilized enzymes was assayed at different pH values in the range 3.0-7.0}.

#### **Stability in model wine media**

The stability assay was performed at pH 3.5 and 23°C in model wine (ethanol-water 12:88 (v/v) containing 3.5 g/L of tartaric acid, 2.5 g/L of malic acid and 60 mg/L of sodium metabisulfite), by using 10 mg of protein (soluble or immobilized) in 2 mL of solution.

#### **Enzymatic treatment of wine**

The immobilized biocatalyst (1,2 EU of BG, 0,08 EU of Rha and 0,3 EU of Ara) was incubated with a Muscat white wine of the variety Early Muscat from the 2009 vintage (750 mL adjusted to pH 4.0 with 2M NaOH) at 23°C with agitation. At the same time a control of the matrix (Eupergit C) previously blocked with 3M glycine was incubated with the same wine in the same conditions. Both mixtures were agitated and aliquots were taken over time to perform glycosyl-glucose assays. This experiment was performed in triplicate. After use, the biocatalyst was washed with activity buffer and the remaining activity was measured.

#### **Glycosyl-Glucose (G-G) Assay.**

The G-G assay was used to determine the total concentration of glycosides in Muscat wine samples in order to monitor the effect of enzymatic treatment as a function of time.

Glycoside concentration was estimated by the analysis of glycosyl–glucose according to the method of William et al. (1995). In the first step, C18 reverse phase was activated with 10 mL methanol followed by 10 mL distilled water. A volume of 10 mL of wine was loaded on the column and washed with 50 mL distilled water. Glycosides were eluted with 1.5 mL ethanol followed with distilled water to a final volume of 5 mL.

In the second step, glycosides were hydrolyzed in acidic conditions according to the method of William et al.(1995). In the final step, released D-glucose concentration was estimated by an UV spectrophotometric method using a hexokinase/D-glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme assay kit. For each independent experiment, G–G analysis was performed in duplicate.

#### **Isolation of Volatiles. Solid Phase Extraction Using ENV+ Cartridge.**

Volatiles were quantified after adsorption and separate elution from an Isolute ENV+ cartridge packed with 1g of highly cross-linked styrene-divinyl benzene (SDVB) polymer (40-140  $\mu\text{m}$ , cod. no. 915-0100-C) as previously reported (Boido et al. 2003). The cartridges were sequentially equilibrated with methanol (15 mL) and distilled water (20 mL). A sample of 50 mL of wine diluted with 50 mL of distilled water and containing 0.1 mL of internal standard (1-heptanol at 230 ppm in a 50% hydroalcoholic solution) was applied with an appropriate syringe (4-5 mL/min) and the residue was washed with 15 mL of distilled water. The aroma components were eluted with 30 mL of dichloromethane; the solution was dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated to 1.5 mL on a Vigreux column, stored at  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , and, immediately prior to GC-MS analysis, further concentrated to 100  $\mu\text{L}$  under a gentle nitrogen stream.

#### **Identification and Quantification.**

GC-MS analyses were conducted using a Shimadzu QP 5050 mass spectrometer equipped with reference libraries (Adams, 2001; McLafferty and Stauffer, 1991) using a BP 20 (SGE, Ringwood, Australia) bonded fused silica capillary column (25 m x 0.25 mm i.d.), coated with poly (ethylene glycol) (0.25  $\mu\text{m}$  phase thickness). The extract was analyzed by GC-MS using the conditions previously described (Fariña et al, 2005). The identification of the compounds was confirmed by injection of pure standards and comparison of their retention index and relevant MS-spectra. Volatile compounds were quantified by GC in the same experimental conditions as previously described for GC-MS, by the internal standard method, using 1-heptanol as the internal standard. The terpenes analyzed were: linalool,  $\alpha$ -terpineol, nerol, geraniol, hodiol I (trans-3,7-dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol) and (trans-3,7-dimethyl-1,7-octadien-3,6-diol) whereas norisoprenoids were: 3-oxo- $\alpha$ -ionol and vomifoliol.

#### **Statistical Analysis.**

One-way analysis of variance (ANOVA) was carried out by using a statistical program (STATISTICA 5.1).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimization of the immobilization procedure

The enzyme preparation from *A. niger* was immobilized onto Eupergit C, an epoxy activated acrylic copolymer which is inert, exhibits good chemical and mechanical properties and is acceptable in the food industry (Hernaiz and Crout, 2000; Mateo et al, 2000). The immobilization reaction is a complex process, in which two non-complementary structures (the surface of a protein and the surface of a support) are forced to react. To achieve this, a careful design of the immobilization conditions is required (Guisan, 2006). Therefore, we have studied the influence of several variables: coupling pH, reaction time, buffer salt concentration and protein load.

#### Coupling pH

The epoxy groups from Eupergit C can react with different groups that are very abundant on the protein surface in a wide range of pH values (Katchalski-Katzir and Kraemer, 2000). In agreement with the higher reactivity of nucleophiles, immobilization yield increased with increasing pH in the range 5-9. As shown in Figure 1a, the three glycosidases studied, namely  $\beta$ -D-glucopyranosidase (BG),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (Ara), and  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase (Rha), showed very good immobilization yields in comparison with previous reports (Tu et al. 2006; Spagna et al. 2002). However, the immobilization efficiency decreased considerably at pH over 7.0, from about 95% for the three enzymes, to 50%, 75% and 58 % for BG, Ara and Rha respectively (Figure 1b). For this reason pH 7 was selected for immobilization, considering the compromise between the yield and the immobilization efficiency of the process.

At neutral pH values, proteins are immobilized onto epoxy-activated acrylic support via a two step mechanism: first, a physical adsorption of the protein on the support; secondly, a covalent reaction between the adsorbed protein and neighboring epoxide groups, initially through the amino terminal group and subsequently by lysines (Mateo et al. 2007). Under the conditions used for immobilization (pH 5.0- 9.0), the soluble enzyme preparation was very stable, preserving 100% of the residual activity for the BG, Ara and Rha but the expressed activity of the immobilized biocatalyst decreased at pH values over 7, pointing out to an extensive multi- puntual crosslinking of the enzymes to the matrix that leads to conformation changes and enzyme inactivation.

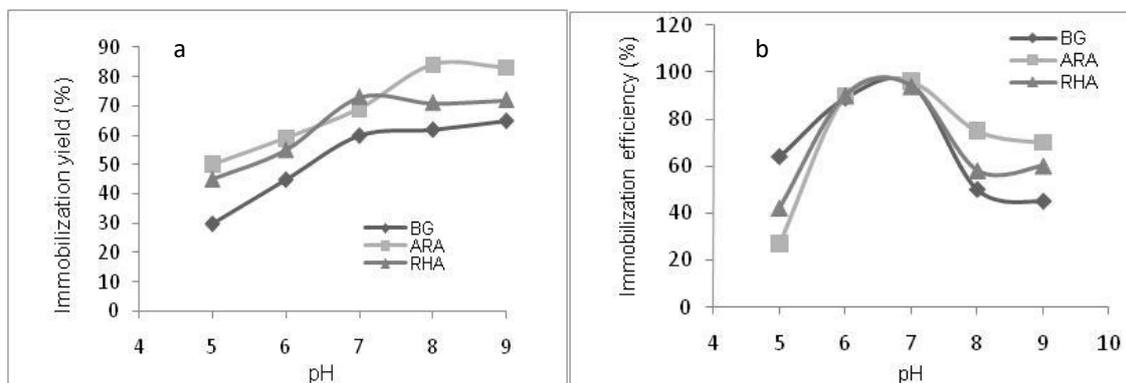


Figure 1. Influence of pH coupling on immobilization yield (a) and efficiency (b) of the three glycosidases.

#### Influence of incubation period

Although the enzyme adsorption to the support may be very rapid, the establishment of a covalent bonding between them is a slow and time-dependent process, which requires the right positioning of

the enzyme groups towards the rigid surface of the support (Tu et al, 2006; Mateo et al, 2000). Under the conditions used, long term incubations were important to increase immobilization yields. As observed in Figure 2, the immobilization yield of the three studied glycosidases increased during the first three days reaching a maximum after 4 days of incubation, with yields of 65%, 63% and 70%, for BG, Ara and Rha respectively. After this incubation period the enzymes were covalently bound to the support, as confirmed by the absence of enzyme desorption upon treatment with low ionic strength buffer and with ethyleneglycol, under the conditions reported in methods (leakage test).

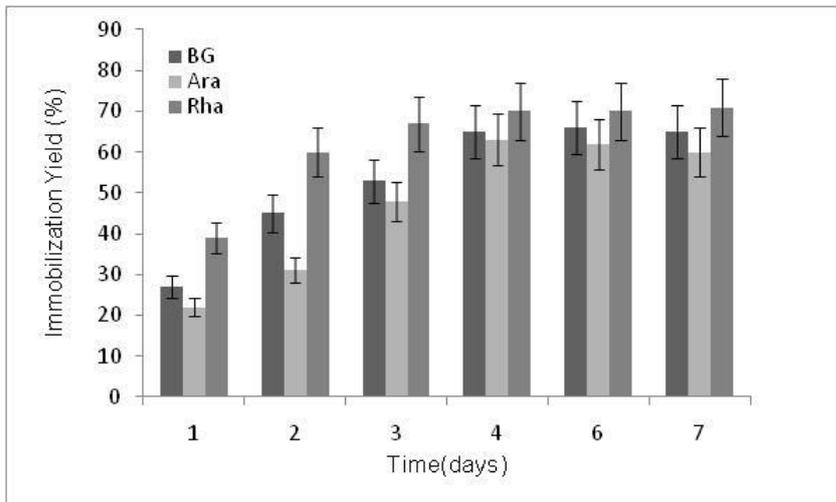


Figure 2. Immobilization yields of the glycosidases at different coupling periods conditions.

#### *Influence of buffer salt concentration*

As expected, the immobilization yield increased with the increase of the buffer salt concentration for the three glycosidases studied. Maximum immobilization efficiency is achieved with 1M potassium phosphate buffer pH 7.0 (Figure 3).

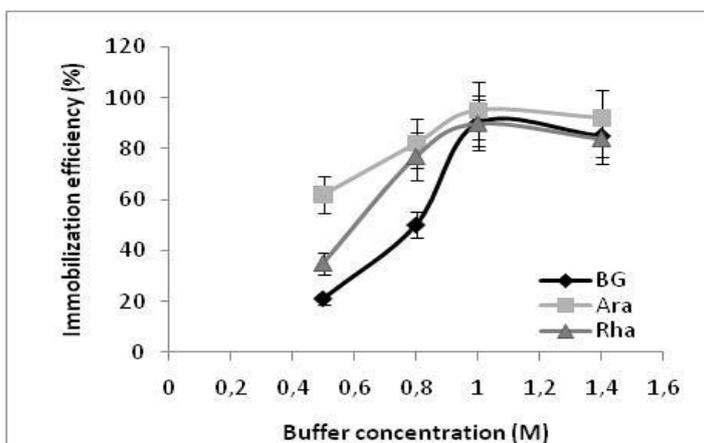


Figure 3. Glycosidases immobilization at different buffer salt concentrations (potassium phosphate pH 7.0) after for 4 days of incubation at 23°C.

#### *Influence of the protein load in the immobilization process*

The effect of increasing the protein loads was studied in the range 35-145 mg protein per gram of support (Table 1). As expected, at the highest protein load, the percentage of bound protein diminished, along with a slight decrease in immobilization efficiency. Therefore, for the three glycosidases, the optimum immobilization efficiency (around 90 %) was obtained for the intermediate protein load (70 mg/g).

Table 1. Effect of protein load on the immobilization efficiency.

mg applied protein/g support	Bound protein		Immobilization Yield (%)			Immobilization efficiency (%)		
	mg/g	%	BG	Ara	Rha	BG	Ara	Rha
35	223.2	63±6.0	68±7.0	85±8.5	77±7.5	83±8.4	91±9.0	100±9.0
70	42±4.6	60±6.2	70±7.1	65±6.9	75±7.5	89±8.5	92±9.0	88±9.0
145	48±5.1	33±4.1	33±3.8	43±5.5	49±5.2	76±7.8	55±6.3	80±8.5

The results are expressed as the media ± coefficient of variation of triplicates.

Overall, the optimum immobilization efficiency for the three enzymes studied was obtained incubating the enzyme preparation (0.15 ml, 70 mg protein/g support) at 23°C during 4 days in 1M potassium phosphate buffer pH 7.0. Under these conditions, the immobilized derivative contained 42 mg/g of protein expressing 7 EU/g of BG, 0,3 EU/g of Ara, and 1,4 EU/g of Rha. The immobilization yields achieved (around 70%) are very good with respect to previous reports (Mateo et al., 2007; Gallifuoco et al., 1988; Tu et al., 2006; Spagna et al., 2003; Tanriseven et al., 2005).

#### Characterization of immobilized enzyme

The optimum pH values for the immobilized glycosidases were maintained with respect to the corresponding values of the soluble enzymes, and their respective pH profiles were not significantly different in the pH range studied (pH 3 to 8).

#### Stability in model wine

Concerning enzyme stability, we studied the behavior of glycosidases in model wine media at pH 3.5 to simulate real wine conditions (Figure 4). Although the commercial soluble preparation is very stable, the immobilization process allowed a further stabilization at pH 3.5, particularly for the arabinosidase enzyme in which the residual activity increased from 18 to 100 % (stabilization factor of 5) after 70 days of incubation.

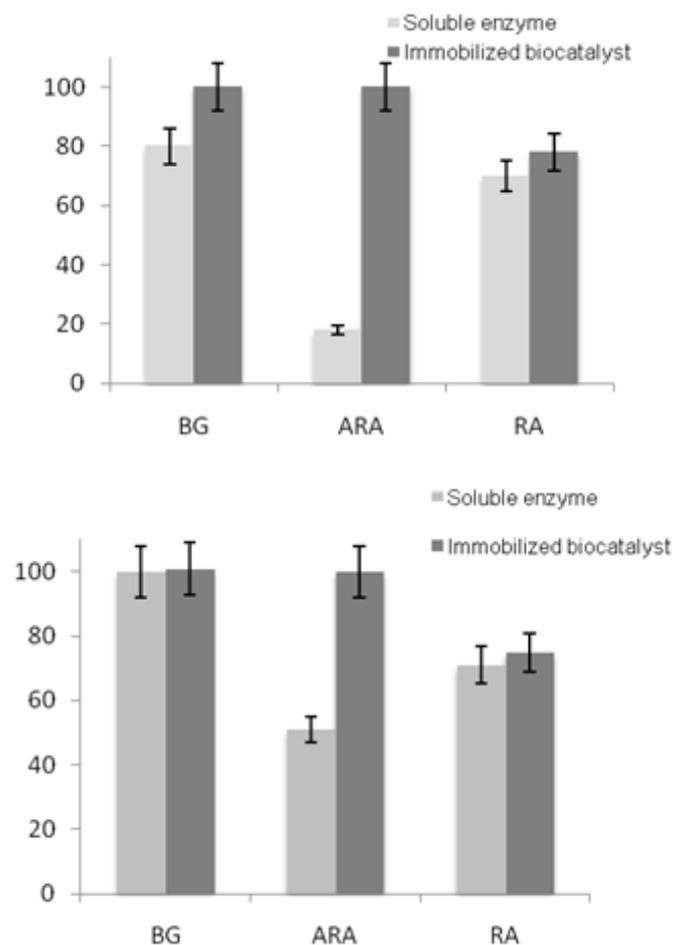


Figure 4. Stabilities of glycosidases in model wine at pH 4.0, after 70 days of incubation at room temperature. Model wine consist of ethanol-water 12:88 (v/v) containing 3.5 g/L of tartaric acid, 2.5 g/L of malic acid and 60 mg/L of sodium metabisulfite.

#### The Glycosyl-Glucose value decreases by the derivative glycosidase-*A.niger*-Eupergit activity.

The immobilized biocatalyst was used to study the activity of the glycosidases on wine glycosides from Muscat wine. The time-course of the reaction was monitored by determination of the glycoside concentration by the G-G assay. In this assay the concentration of glycosides is determined by assaying glucose with an enzymatic kit (G-G value). As shown in Figure 5, a substantial decrease in the G-G value from 120 to 80  $\mu\text{M}/\text{mL}$  was observed during the course of the 20 days of incubation of immobilized glycosidases with Muscat wine. After this time, the derivative was separated from the wine and the released aromas analyzed. The G-G value of control wine without enzymes remained practically constant at around 120  $\mu\text{M}/\text{mL}$  during the incubation period. The immobilized biocatalyst was extremely stable under these experimental conditions, preserving 95% of its initial activity before incubation with Muscat wine.

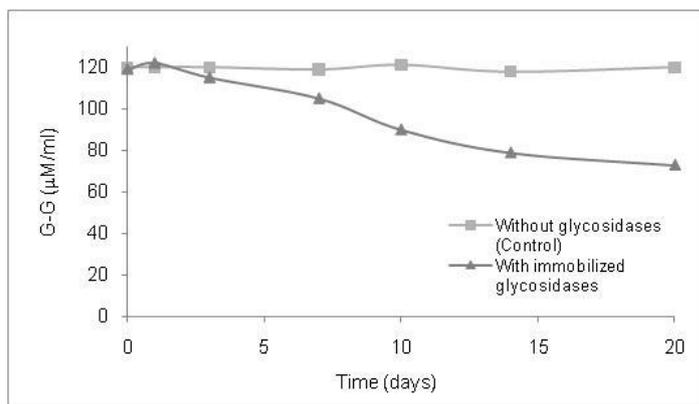


Figure 5. Effect of the immobilized biocatalyst on the glycosides content of Muscat wine at pH 4.0 and 23°C.

### Hydrolysis of aromatic precursors

The activity of glycosidases on the aromatic precursors of wine is expected to release monoterpenes and norisoprenoids and therefore to increase the varietal aroma of wines. The treatment of Muscat wine with the immobilized glycosidases achieved the release of monoterpenes (linalool,  $\alpha$ -terpineol and geraniol) as well as norisoprenoids (vomifoliol and 3-oxo- $\alpha$ -ionol) (Table 2). ANOVA analysis showed that the wine treatment with the immobilized glycosidases has a significant effect on the release of glycosides, showing an increase in monoterpenes (from 1143 to 2131  $\mu\text{g/L}$   $p < 0,0172$ ) and norisoprenoids (from 0 to 27  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,001$ ) with respect to control wine.

Table 2. Effect of immobilized glycosidases on the concentration of aromatic compounds in Muscat wine.

Aromatic compounds	Without glycosidases ( $\mu\text{g/L}$ )	With immobilized glycosidases ( $\mu\text{g/L}$ )
Linalool	579 $\pm$ 43	615 $\pm$ 234
$\alpha$ -terpineol	182 $\pm$ 12	246 $\pm$ 10
Geraniol	97 $\pm$ 5	438 $\pm$ 15
oxide A (trans-furanic of linalool)	47 $\pm$ 9	213 $\pm$ 46
oxide B (cis-furanic of linalool)	27 $\pm$ 5	99 $\pm$ 2
oxide C (trans-piranic of linalool)	151 $\pm$ 31	386 $\pm$ 28
oxide D (cis-piranic of linalool)	58 $\pm$ 7	135 $\pm$ 32
<b>Total terpenes</b>	1143 $\pm$ 94	2131 $\pm$ 122
Vomifoliol	nd	20 $\pm$ 1,7
3-oxo- $\alpha$ -ionol	nd	7 $\pm$ 0.3
<b>Total norisoprenoids</b>	<b>nd</b>	<b>27 <math>\pm</math>1,9</b>

nd: below the limit of detection

## CONCLUSIONS

We have developed an immobilized biocatalyst with multiple glycosidase activities ( $\beta$ -D-glucopyranosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, and  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase) from a commercial preparation maintaining the characteristics of simplicity and cheapness that are indispensable to its potential use in oenology. The objective was achieved through the covalent immobilization of the mixtures of glycosidases onto epoxy-activated acrylic support which allowed high percentage of expressed activity for the three enzymes studied and good stability under wine conditions.

When Muscat wine was treated with the immobilized biocatalyst, the amount of free monoterpenes and norisoprenoids was increased significantly, which confirms its activity on the aromatic glycosidic precursors. Since immobilized biocatalysts have inherent advantages over soluble enzyme preparations, this derivative is promising for technological applications. Noteworthy, one of the most well known drawbacks of the use of soluble commercial preparations is the impossibility to control the hydrolysis process, which is easily overcome by using immobilized biocatalyst.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge support from Fondo Clemente Estable (Dicyt), Program for the Development of Basic Sciences, (PEDECIBA-Química) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

## REFERENCES

- Adams, R. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy; Allured: Carol Stream, IL, 2001.
- Aryan A, Wilson B, Strauss C, and Williams P. The Properties of Glycosidases of *Vitis vinifera* and a Comparison of Their  $\beta$ -Glucosidase Activity with that of Exogenous Enzymes. An Assessment of Possible Applications in Enology. *Am. J. Enol. Vitic.* (1987)38:3:182-188
- Aziz Tanriseven and Yakup Aslan. Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* (2005) 36:550-554.
- Boido E, Lloret A, Medina K, Fariña L, Carrau F, Versini G, Dellacassa E. Aroma composition of *Vitis Vinifera* cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 5408-5413.
- Fariña L, Boido E, Carrau F, Versini G, Dellacassa E. Terpene Compounds as Possible Precursors of 1,8-Cineole in Red Grapes and Wines. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1633-1636
- Gallifuoco A, D'Ercole L, Alfani F, Cantarella M, Spagna G, Pifferi G. On the use of chitosan-immobilized  $\beta$ -glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition. *Process Biochemistry*, Volume 33, Number 2, February 1998, pp. 163-168(6)
- Guisán J.M. Immobilization of enzymes as the 21th Century Begins: An already solved problem or still an exciting challenge? in *Immobilization of enzymes and cells*. Cap 1. *Methods in Biotechnology* 22, Ed by J.M. Guisan, Humana Press.
- Günata Z, Bayonove C, Tapiero C and Cordonnier R. Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -glucosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agric. Food Chem* (1990) 38: 1232-1236.

Gunata Z, Dugelay I, Sapis J, Baumes R, and Bayonove C. Role of enzyme in the use of the flavor potential from grape glycosides in winemaking. In: Schreier P, Winterhalter P, editors. Progress in flavor precursor studies (Schreier, P. And Winterhalter, P., Eds). Allured, Wheaton, IL, 1993, 219-234.

Gunata Z, Vallier M, Sapis J, Baumes R, and Bayonove C. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: Libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. J. Int. Sci.Vigne Vin 1990, 3, 133-144.

Hernaiz M, Crout D. Immobilization /stabilization on Eupergit C of the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* and  $\alpha$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Enzyme Microb Technol 2000; 27:26-32

Katchalski-Katzir E and Kraemer D. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 10 \_2000. 157–176

Tu M, Zhang X, Kurabi A, Gilkes N, Mabee W and Saddler J. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on Eupergit C for Lignocellulose Hydrolysis. Biotechnology Letters (2006) 28:151-156.

Mateo C, Grazú V, Pessela B, Montes T, Palomo JM, Torres R, López-Gallego F, Fernández-Lafuente R and Guisán J.M. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. 7th International Conference on Protein Stabilization 2007.

Mateo C, Abian O, Fernandez-Lafuente R. Increase in the conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint attachment. Enzyme Microb Technol 2000; 26: 509-515.

McLafferty F, Stauffer D. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 5th ed.; Wiley: New York, 1991.

Palmeri R, Spagna G. Beta-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. Enzyme Microb. Technol 2007; 40(3):382-389

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1987 May 15;163 (1):279.

Spagna G, Barbagallo R, Greco E, Manenti I and Pifferi G. A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilised by inclusion in chitosan gels. Enzyme and microbial Technology (2002) 30:80-89.

Williams P, Cynkar W, Francis L, Gray J, Iland P, Coombe B. Quantification of glycosides in grapes, juices, and wines through a determination of glycosyl glucose. J Agric Food Chem 1995; 43: 121-128.