

“Evaluación de actividad enzimática en levaduras de origen enológico potencialmente probióticas”

Abad Camila^b, Leiva Alaniz, María José^{a,b}, Vergara Alvarez, Silvia Cristina^{a,b}, Terrera Natalia^b, Anabel Araya^b, Maturano, Yolanda Paola^{a,b}

a Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

b Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de San Juan.

majoleiva4@gmail.com

Resumen

Los probióticos son microorganismos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped. Para determinar si un microorganismo puede considerarse probiótico, debe evaluarse si ejerce al menos un efecto benéfico para la salud, entre otros requisitos. Las levaduras son eucariotas unicelulares que están ganando importancia en el campo de los probióticos. Ciertos probióticos mediante la secreción de enzimas que favorecen la digestión, mejoran la capacidad digestiva, promueven la absorción de nutrientes y reducen ciertos compuestos antinutricionales específicos. El propósito de este trabajo fue evaluar cuali- cuantitativamente la capacidad de producir enzimas potencialmente promotoras de la digestión de 14 levaduras no-*Saccharomyces* de origen enológico. Las actividades de proteasas, lipasas, amilasas, esterases, β -galactosidasas, β -glucosidasas y fitasas se detectaron cualitativamente inoculando una suspensión de cada levadura (1×10^6 cél/ml) en placa con medios específicos agarizados (incubación: 30°C, 48h). Además, se analizaron cuantitativamente las actividades β -glucosidasas y fitasas. Ningún aislamiento mostró actividad β -galactosidasa, esterasa ni amilasa. Todos los aislamientos produjeron lipasas y fitasas. Además, las levaduras PB15, PB50, PB54, PB97 y PB98 registraron actividad proteolítica. Las levaduras PB15, PB97, PB98, PB99 y PB100 exhibieron actividad β -glucosidasa en placa. Las levaduras de la especie *W. anomalus* mostraron los mejores resultados cuantitativos en la producción de fitasas y β -glucosidasas. Las numerosas actividades enzimáticas registradas por las levaduras podrían tener un impacto positivo en procesos digestivos y, en consecuencia, favorecerían el bienestar general del individuo. Este estudio constituye la base para futuros estudios acerca de la modulación de la microbiota y regulación del balance gastrointestinal.

Palabras clave: Levaduras, probióticos, enzimas, no-*Saccharomyces*.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos de levadura están ganando un mayor interés tanto en la investigación como en el consumo (Staniszewski et al., 2021). Este interés es principalmente el resultado de su amplia aplicabilidad en la industria alimentaria y sus propiedades distintivas en el tracto digestivo (Vergara et al. 2023). Para clasificar un microorganismo como probiótico, debe contar con suficientes estudios y evidencia documentados (Hill et al. 2014). Ciertos microorganismos son indispensables en el metabolismo de alimentos complejos (Ogunremi et al. 2015), ya que incrementan la capacidad digestiva, optimizan la absorción de nutrientes y disminuyen la presencia de compuestos antinutricionales específicos. Esta actividad metabólica contribuye a la mejora general de la salud intestinal de los consumidores (Mugwanya et al. 2021). El grupo de investigación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de San Juan, Argentina, ha evaluado diferentes especies de levaduras autóctonas de la provincia de San Juan (Maturano et al. 2012, Mestre et al. 2017, Kuchen

et al. 2019). En un estudio reciente, Vergara et al. (2023) seleccionaron 14 aislados de levadura no *Saccharomyces*, que son candidatos potenciales a probióticos.

OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue evaluar cuali- cuantitativamente la capacidad de 14 levaduras no-*Saccharomyces* de origen enológico de producir enzimas potencialmente promotoras de la digestión.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron 14 cepas de levadura no-*Saccharomyces* de origen vitivinícola, debido a su bioseguridad y resistencia a las condiciones gastrointestinales (Vergara et al. 2023). Las cepas incluyen: *Hanseniaspora guilliermondii* (PB15), *Pichia kudriavzevii* (PB100, PB48, PB50, PB51, PB52, PB53), *P. manshurica* (PB54), *P. occidentalis* (PB56, PB57, PB58), *Wickerhamomyces anomalus* (PB97, PB98, PB99). Además, se utilizó como referencia la levadura probiótica comercial *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCMI-745 (Sb). Los

aislados de levadura se activaron utilizando caldo medio YEPD que contenía (g l⁻¹): extracto de levadura 10; peptona 20; dextrosa 20). Luego se incubaron a 28 ±1°C durante 48 h bajo agitación constante a 100 rpm.

1- Ensayos enzimáticos cualitativos

Para evaluar actividades enzimáticas específicas, se inocularon 5 ml de una suspensión estandarizada de cada levadura previamente activada (1x10⁶ CFU ml⁻¹) en la superficie de una placa de agar solidificado, la cual se incubó a 30 ±1°C durante 48 horas. Se evaluaron las siguientes actividades:

1. Actividad lipasa: se realizó siguiendo el protocolo de Maturano et al (2009).
2. Actividad amilasa: se realizó siguiendo el protocolo de Maturano et al (2009).
3. Actividad esterasa: se realizó siguiendo el protocolo de Maturano et al (2009).
4. Actividad proteasa: se realizó siguiendo el protocolo de Mestre et al. (2017).
5. Actividad β-galactosidasa: se realizó siguiendo el protocolo de (Syal et al. 2013).
6. Actividad fitasa: se realizó siguiendo el protocolo de Ogunremi et al. (2015).
7. Actividad β-glucosidasa (g l⁻¹): se realizó siguiendo el protocolo de Mestre et al. (2017).

2- Ensayos enzimáticos cuantitativos

1. Actividad fitasa: se realizó siguiendo el protocolo de Ogunremi et al. (2020).

El crecimiento relativo se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Crecimiento relativo (\%)} = \frac{A_i - A_o}{A_i} \times 100$$

Donde A_i es la absorbancia del medio libre de fosfato o medio con fitato mínimo, y A_o es la absorbancia inicial.

2. Actividad β-glucosidasa: se realizó siguiendo el protocolo de Maturano et al. (2011). Se utilizó nitrofenol para realizar la curva de calibración.

RESULTADOS

La Figura 1 muestra las actividades enzimáticas cualitativas en las levaduras estudiadas cualitativamente. Ninguna de las levaduras exhibió actividad β-galactosidasa, esterasas o amilasas en los medios ensayados.

Se cuantificó la enzima fitasa (Figura 2). Las tres cepas de *W. anomalus*, PB97, PB98 y PB99, exhibieron la mayor actividad fitasa: 76.3, 77.16 y 73.91%, respectivamente. En el ensayo cuantitativo de actividad

β-glucosidasa, las levaduras *W. anomalus* (PB97, PB98, PB99) destacaron claramente por su concentración en el sobrenadante: 1,592.51, 1,901.67 y 2,722.58 Unidades g⁻¹, respectivamente. La levadura de referencia *S. boulardii* siguió con un valor de 138.10 Unidades g⁻¹. Además, estas mismas tres levaduras de *W. anomalus* demostraron la mayor producción de enzimas en el espacio periplásmico, con valores de 483.57, 265.16 y 347.83 Unidades g⁻¹, respectivamente.

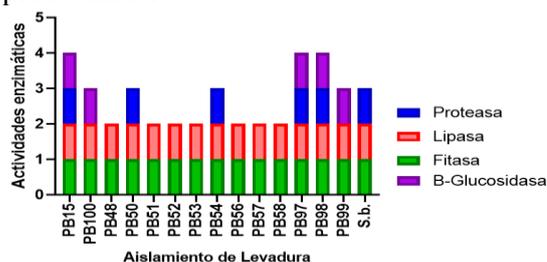


Figura 1: Detección de la producción de enzimas extracelulares por cepas de levadura. La figura muestra las actividades enzimáticas cualitativas presentadas por cada levadura. Se asignó un valor de 1 si la actividad estaba presente y un valor de 0 si estaba ausente. Referencias: el color azul representa la actividad de proteasa, el color rojo representa la actividad de lipasa, el color verde representa la actividad de fitasa y el color púrpura representa la actividad de β-glucosidasa.

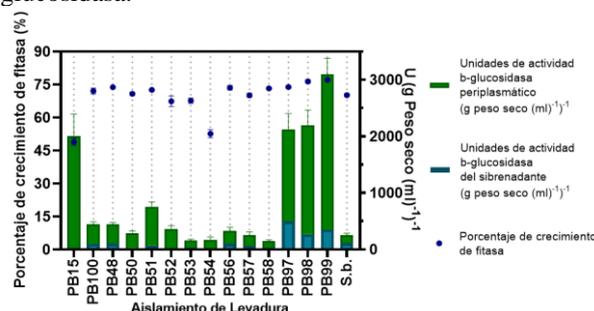


Figura 2: Actividad enzimática cuantitativa de fitasa y β-glucosidasa. El eje izquierdo muestra el valor promedio del porcentaje de crecimiento de la actividad enzimática de fitasa, el cual se graficó con puntos. El eje derecho muestra la concentración de la actividad enzimática de β-glucosidasa, la cual se evaluó en el sobrenadante y el periplasma, graficado con barras apiladas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las levaduras probióticas tienen diversos beneficios en el tracto gastrointestinal, como la producción de enzimas que participan principalmente en la asimilación y digestión de los alimentos. Las proteasas

contribuyen a la descomposición de proteínas, lo que da como resultado péptido bioactivos con propiedades antihipertensivas, inmunomoduladoras, opioides, antimicrobianas y antioxidantes (Esteve-Zarzoso et al. 1998). La fitasa es otra enzima deseable, debido a que es una fosfatasa que mejora la biodisponibilidad mineral y también libera ésteres de fosfato inorgánico y de inositol fosfato, que tienen propiedades anticancerígenas al regular diversas funciones celulares (Vucenik et al. 2006). Los aislados de levadura evaluados en el presente estudio demostraron la capacidad de producir enzimas fitasa en *P. kudriavzevii*, *P. occidentalis* y *W. anomalus* con concentraciones un 60% superiores a las de la cepa de referencia.

Finalmente, se evaluó cuantitativamente la β -glucosidasa, una enzima nutricional importante debido a su capacidad para catalizar la hidrólisis de ciertos β -glucanos que se encuentran en varios cereales (Seng et al. 2014). En las mismas condiciones, Maturano et al. (2009) informaron que *W. anomalus* (anteriormente *Pichia anomalus*) mostró la mayor producción de β -glucosidasa de varias especies de levadura analizadas. Los autores encontraron valores de 3.000 U g^{-1} en el sobrenadante libre de células y 13.000 U g^{-1} en el espacio periplásmico, concentraciones superiores a las observadas en el presente estudio tanto en el sobrenadante periplásmico como en el libre de células. También encontraron una buena producción en la levadura *Hanseniaspora vineae* con un valor de 11000 U g^{-1} en el espacio periplásmico.

Se destacó el potencial de los aislados de *Hanseniaspora guilliermondii* y *Wickerhamomyces anomalus* en la producción de enzimas digestivas tanto cualitativamente cómo cuantitativamente. Este estudio proporciona una base sólida para la futura selección de levaduras vitivinícolas con potencial probiótico, con aplicaciones en la salud y en la industria alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.

J Kuchen, B., Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Combina, M., Toro, M. E., & Vazquez, F. (2019). Selection of native non-Saccharomyces yeasts with biocontrol activity against spoilage yeasts in order to produce healthy regional wines. *Fermentation*, 5(3), 60.

Maturano, Y. P., Assaf, L. A. R., Toro, M. E., Nally, M. C., Vallejo, M., de Figueroa, L. I. C., ... & Vazquez, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts during wine fermentation. *International journal of food microbiology*, 155(1-2), 43-50.

Mestre Furlani, M. V., Maturano, Y. P., Combina, M., Mercado, L. A., Toro, M. E., & Vazquez, F. (2017). Selection of non-Saccharomyces yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: A strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research*, 17(2), fox010.

Mugwanya, M., Dawood, M. A., Kimera, F., Sewilam, H. (2021). Updating the role of probiotics, prebiotics, and synbiotics for tilapia aquaculture as leading candidates for food sustainability: A review. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1-28.

Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., Agrawal, R. (2015a). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.

Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. *Foods*, 10(6), 1306.

Vergara, S. C., Leiva, M. J., Mestre M. V., Vazquez, F., Mancha, P., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023b). Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genetics and Biology*, 164, 103767.