

SISTEMAS ENZIMÁTICOS MICROBIANOS QUE ASISTEN EN LA MACERACIÓN IMPACTANDO EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TECNOLÓGICAS DEL VINO

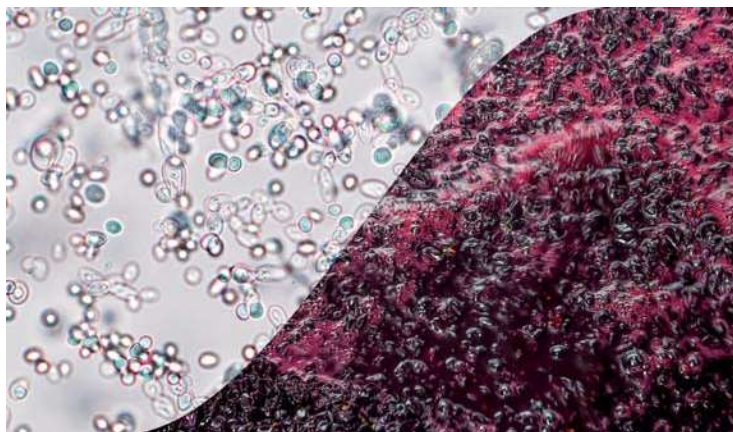
S. J. Longhi^{1,2}, M. C. Martín^{1,2}, V. I. Morata^{1,2}

¹Laboratorio de Biotecnología - Depto. de Biología y Alimentos - Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria - Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael, Mendoza, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

slonghi@fcai.uncu.edu.ar

Este trabajo recibió la Segunda Mención en el "Premio AATA 50 años" durante el XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CyTAL 2019), llevado a cabo en Buenos Aires del 20 al 22 de noviembre.



RESUMEN

El vino es el producto de un proceso complejo en el que tiene lugar la conversión bioquímica del mosto de uva por acción de la microbiota levaduriforme y de múltiples reacciones químicas catalizadas por enzimas. Entre éstas, las polisacaridasas degradan polímeros de paredes celulares de la baya de uva y mejoran diversos aspectos sensoriales y tecnológicos (extracción de jugo y rendimiento, clarificación, filtrabilidad, estabilidad coloidal, extracción de compuestos de aroma y color) y facilitan la liberación de polifenoles, entre los cuales se encuentran los compuestos bioactivos. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar, en base al desempeño tecnológico en el proceso de vinificación, microorganismos autóctonos de la región DOC San Rafael-Mendoza, previamente aislados de superficie de uva, productores de sistemas multi-enzimáticos despolimerizantes de paredes celulares. Se realizó una primera selección en base a actividades enzimáticas: pectinasas, celulasas, xilanasas, amilasa-

sas, β -glucosidasas y proteinasas. La segunda selección se basó en la correlación entre la actividad enzimática y el efecto producido en el mosto. Para la producción de los extractos enzimáticos, las cepas se inocularon en medios de cultivos líquidos que contenían pectina (1%) como inductor. Los cultivos fueron incubados en condiciones similares a las de vinificación (pH 3,8 y 28°C) durante 72 horas. La actividad pectinolítica se determinó valorando los azúcares reductores liberados desde un medio con pectina mediante el reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para evaluar el efecto de los extractos enzimáticos se realizó una maceración con 20 mL de mosto de uva, dosificados en idénticas unidades enzimáticas netas (EU), llevada a cabo por duplicado, a baja temperatura (12°C) y a temperatura tradicional de vinificación (28°C). Se realizaron controles con una enzima comercial de uso enológico y con mosto sin inocular (control negativo). Se realizaron ensayos de clarificación, filtrabilidad, determinación del índice de polifenoles totales (IPT), índice de color (IC), matiz, parámetros CIELAB y cuantificación de polifenoles totales. De un total de 21 cepas de levaduras, pertenecientes a 11 géneros, todas mostraron un marcado efecto de la actividad enzimática sobre los parámetros tecnológicos evaluados, respecto al control negativo. En cuanto al IPT una cepa de *Aureobasidium pullulans* presentó el mayor índice a ambas temperaturas de ensayo, presentando a su vez la mayor actividad pectinolítica. Se observó un notable aumento del IC respecto a los controles, efecto que fue más marcado a 28°C. *Torulaspota delbrueckii* tuvo marcada influencia de su actividad pectinolítica en la filtrabilidad y clarificación del mosto a ambas temperaturas de ensayo, como así también en la extracción de polifenoles totales a baja temperatura, diferenciándose del resto para estos efectos. Los

resultados obtenidos sugieren que las levaduras seleccionadas en una primera instancia pueden realizar un aporte positivo en cuanto a la degradación de polímeros presentes en el mosto, posibilitando su empleo en etapas de maceración tradicional y a bajas temperaturas. Del análisis de estos resultados se seleccionarán las mejores cepas con el perfil enzimático óptimo.

Palabras clave: polisacaridasas, levaduras, maceración, vinificación.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas enzimáticos microbianos presentan un gran interés en la mejora de ciertos aspectos tecnológicos y sensoriales en la elaboración del vino. Son aplicados en la etapa de maceración por su contribución en el proceso de clarificación y en la filtrabilidad de mostos y vinos, así como en la liberación de compuestos fenólicos presentes en la baya de uva. Esta liberación es posible gracias a su acción hidrolítica sobre los polisacáridos que constituyen la pared de las células vegetales. Estos preparados enzimáticos contienen en general una mezcla de actividades. En particular, las polisacaridasas cumplen un papel primordial en la degradación de los polímeros de la pared celular. Estas incluyen a las pectinasas, amilasas, celulasas y xilanasas.

Otras enzimas muy relacionadas a las anteriores son las β -glucosidasas, las cuales son críticas en la liberación de los compuestos aromáticos, ya que actúan sobre los glicósidos previamente hidrolizados por las otras enzimas pero, a su vez, son capaces de hidrolizar los compuestos antociánicos produciendo pérdidas de color en los vinos tintos (Romero-Cascales y col., 2012), y las enzimas proteolíticas, responsables de mejorar el contenido nutricional de los mostos y la producción de precursores de compuestos aromáticos, así como también están implicadas en la reducción de la estabilidad proteica de los vinos (Dizy y Bisson, 2000; Belda y col., 2016).

Por su parte, las pectinasas son sistemas enzimáticos capaces de romper los polímeros pécticos de las paredes celulares de la baya y han mostrado una gran influencia tanto en las propiedades sensoriales como en las propiedades tecnológicas de los vinos (Maturano y col., 2015; Fratebianchi y col., 2017). Al exponer componentes de las células también afectan el curso de la fermentación y de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el proceso (Merín y col., 2011).

En cuanto a las celulasas y hemicelulasas, contribuyen a incrementar la extracción del jugo de uva y a mejorar la clarificación de los vinos (Romero-Cascales y col., 2008).

Con respecto a la adición de enzimas de uso enológico en vinificaciones en tinto -y sobre la base de trabajos previos (Martín y Morata, 2013- 2014; Merín y col., 2015; Yu y col., 2016; Yu y col., 2019)- se puede afirmar que las diferentes actividades carbohidrasas y enzimas relacionadas que componen los preparados enzimáticos tienen diferentes acciones hidrolíticas sobre las paredes celulares y en función de esto van a producir efectos distintos sobre la composición del mosto-vino. Recientemente, se han reportado avances científicos sobre la composición química y estructural de la pared celular de bayas de uva y sobre la acción hidrolítica de enzimas comerciales sobre sus polisacáridos constituyentes (Yu y col., 2016; Gao y col., 2019).

En el presente trabajo se propone indagar las diversas actividades de los sistemas enzimáticos microbianos y relacionarlas con los atributos de color y propiedades tecnológicas más relevantes en la vinificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y selección de microorganismos productores de enzimas polisacaridasas

Se tomaron muestras de uva de la región vitivinícola DOC San Rafael-Mendoza. El aislamiento fue realizado desde la superficie de la baya. Se utilizaron medios selectivos para levaduras, como el medio WL (Wallerstein Laboratory) y el medio MEA-agar extracto de malta. La siembra se hizo para todas las muestras por duplicado para incubar a dos temperaturas de ensayo, 15°C y 28°C. La producción de enzimas pectinasas, celulasas, xilanasas, amilasas y proteinasas fue detectada mediante el método semicuantitativo en placa con medios de cultivo suplementados con el polímero o sustrato específico. La formación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias y su diámetro se reveló mediante el agregado de colorantes específicos. Cepas controles positivos y negativos fueron utilizados en cada caso.

Identificación fenotípica y genotípica de levaduras secretoras de polisacaridasas

La identificación fenotípica se llevó a cabo siguiendo los criterios taxonómicos descritos por Kurtzman y Fell (2000) según sus características morfológicas y fisiológicas. La identificación molecular a nivel de especie se realizó por PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 del complejo génico de ADN nuclear. La reacción de PCR se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos descritos por Esteve-Zarzoso y col. (1999) con algunas modificaciones utilizando los cebadores universales ITS1 y ITS4 ya descritos por White *et al.* (1990).

Producción de extractos enzimáticos extracelulares

Las levaduras seleccionadas se inocularon en un medio líquido (Moyo y col., 2003, con ligeras modificaciones) a pH 3,8 (pH del vino). Los cultivos fueron incubados bajo condiciones de agitación (130 rpm) a 28°C durante 72 h. Las células se separaron mediante centrifugación (10000xg, 15 min a 4°C) y se eliminaron para obtener los sobrenadantes libres de células (extractos enzimáticos). Se cuantificaron las actividades pectinasa, xilanasa, celulasa y amilasa mediante el método de cuantificación de azúcares reductores con el reactivo DNS, modificado por Qian Li y col. (2015), utilizando diferentes polisacáridos como sustratos. La actividad proteasa se determinó en placa con agar leche según Merín y col., (2015).

Ensayos tecnológicos

Para evaluar los efectos tecnológicos de los preparados enzimáticos microbianos se realizaron maceraciones, a escala laboratorio, con mosto de uva. Para ello, se colocaron en tubos Falcon de 50 mL, 40 g de mosto Malbec y se agregó 1 mL de extracto enzimático crudo (1 U/mL). En paralelo, se realizaron un blanco de reacción con buffer al pH del mosto y un control con enzima comercial (Extrazyme, IOC) dosificada en idénticas unidades enzimáticas netas (EU) que el extracto crudo. Todos los tratamientos se incubaron durante seis horas a dos temperaturas de ensayo, 12°C y 28°C. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

-Clarificación: El porcentaje de transmitancia se consideró una medida de la clarificación del mosto y se determinó a 650 nm (Cavello y col. 2017).

-Filtrabilidad: Luego del tratamiento enzimático, se hizo pasar el mosto por un filtro de 25 cm de diámetro y 15 µm de poro, con una fuerza de vacío de 0.9 Bar, como describe Belda y col., (2016) con ligeras modificaciones. La filtrabilidad se expresó como los segundos necesarios para filtrar 1 mL de muestra.

-Ensayos de color: La extracción de color se evaluó determinando los parámetros clásicos intensidad del color (IC), matiz e índice de polifenoles totales (IPT), según Glories y col. (1984) y Ribéreau-Gayon y col. (2006). Se determinaron además las coordenadas CIE-LAB según el método estándar de la Commission Internationale de L'Eclairage (CIE, 1986). Por último, se determinó el Contenido de Polifenoles Totales (CPT) según el método de Folin-Ciocalteu (Liang-YuChen y col., 2015).

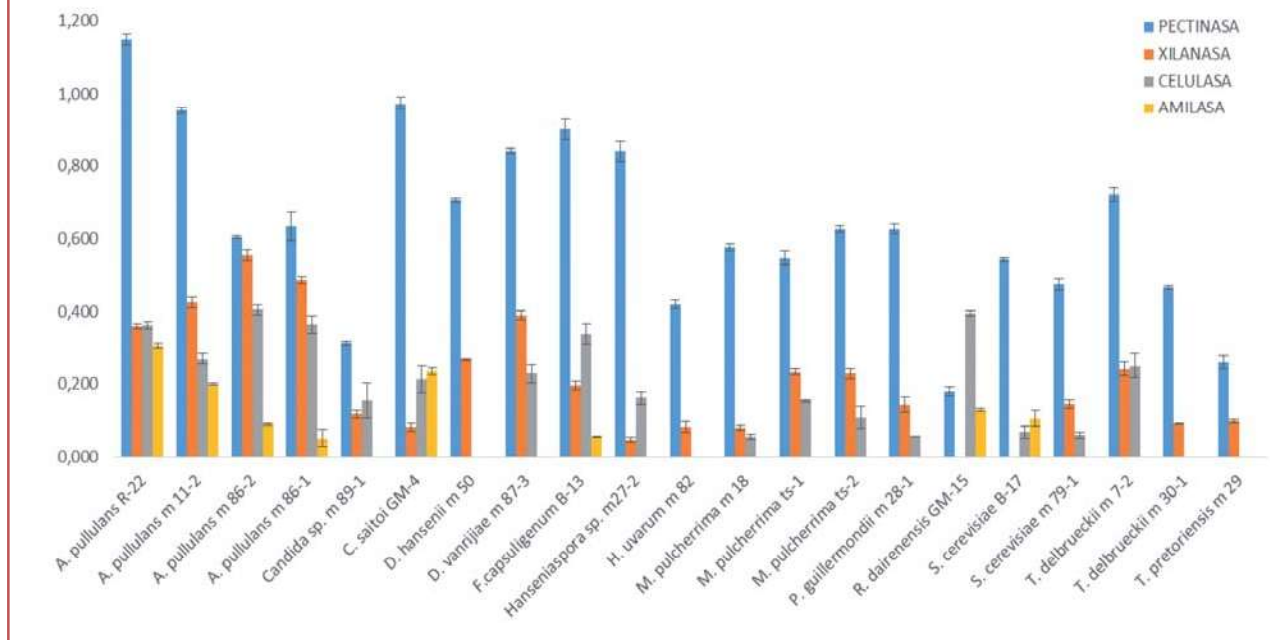
Análisis estadístico

Los datos experimentales son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar. Análisis de la varianza (ANOVA) fue aplicado sobre dichos datos, la comparación de los valores medios se realizó mediante la prueba de diferencias menos significativas de Fisher, realizada a un nivel de significancia p<0,05, usando el programa Statgraphics Plus ver. 5.1.

TABLA 1 - Productos de PCR y fragmentos de restricción de las especies identificadas por la técnica PCR-RFLP de la región ITS1-5,8S-ITS2 del ADNr.

Cepa	Especie	Producto amplificado (pb)	Fragmentos de restricción (pb)		
			CfoI	HaeIII	HinflI
m 11-2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	190+180+100	450+150	290+180+130
m 86-2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	190+180+100	450+150	290+180+130
m 86-1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	190+180+100	450+150	290+180+130
m 89-1	<i>Candida sp.</i>	500	220+130	470	250+230
m 50	<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	300+320+50	420+150+100	320+330
m 87-3	<i>Debaryomyces vanrijiae</i>	650	310+300+50	420+140+90	320+320
m 27-2	<i>Hanseniaspora sp.</i>	750	330+320+100	760	330+180+150+80
m 82	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	320+310+100	740	330+180+150+70
m 18	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	210+100+80	280+100	200+180
ts-1	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	210+100+80	280+100	200+180
ts-2	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	210+100+80	280+100	200+180
m 28-1	<i>Pichia guilliermondii</i>	630	300+260+80	400+110+80	320+300
m 79-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	390+360	320+220+180+150	360+150
m 7-2	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	330+220+150+100	800	410+380
m 30-1	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	330+220+150+100	800	410+380
m 29	<i>Torulasporea pretoriensis</i>	825	380+330+110	800	380+290+125

FIGURA 1 - Actividades enzimáticas de las levaduras de origen enológico productoras de polisacaridasas a 28°C y pH 3,8. Una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de azúcar reductor por minuto bajo las condiciones de ensayo



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de 96 cepas de levaduras y microorganismos yeast-like aislados de la superficie de uva, 83 mostraron actividad pectinolítica. En una primera instancia, se seleccionaron aquellas cepas que presentaron la mayor relación diámetro de halo/diámetro de colonia y el mayor diámetro de colonia, es decir, mayor crecimiento. Seguidamente, los aislados fueron estudiados por su capacidad de producir otras actividades enzimáticas de interés enológico, tales como celulasas, xilanasas, proteasas, amilasas y β-glucosidasas, debido a su influencia en diversas propiedades tecnológicas y sensoriales de los vinos. En este sentido, fueron seleccionadas 16 cepas capaces de producir diferentes sistemas multi-enzimáticos. Dichas cepas fueron identificadas genéticamente a nivel de género y especie. Como puede observarse en la Tabla 1, los aislados pertenecieron a los géneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Torulaspota*.

Adicionalmente, junto con las cepas seleccionadas, se incluyeron en el presente estudio otros microorganismos pectinolíticos de la colección microbiana del Laboratorio de Biotecnología de la FCAI de la UNCuyo (CC Biodiversidad San Rafael). Dichas cepas fueron: *Aureobasidium pullulans* R-22, *Cryptococcus saitoi* GM-4, *Filobasidium capsuligenum* B-13, *Rhodotorula dairenensis* GM-15 y *Saccharomyces cerevisiae* B-17.

En la Figura 1 se pueden observar las distintas actividades polisacaridasas evaluadas para cada cepa a 28°C y pH 3.8. En cuanto a la actividad pectinolítica, todas las cepas presentaron niveles considerables de actividad, en particular la cepa *Aureobasidium pullulans* R-22 presentó el valor más alto (1,149 UE/mL). Dicha cepa y *A. pullulans* m11-2 mostraron un pool enzimático de las cuatro actividades evaluadas, con significativa actividad pectinolítica. Mientras que las otras dos cepas de *A. pullulans* (m86-1 y m86-2) tuvieron las más altas actividades celulasa y xilanasas. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente por Belda y col (2016), quienes encontraron que todas las cepas *A. pullulans* aisladas de uvas (100% de los aislados de esta especie) presentaron actividad celulasa y pectinasa. Por otra parte, en la cepa *T. delbrueckii* m7-2, si bien tuvo una actividad pectinolítica baja, sus actividades celulasa y xilanasas fueron significativamente altas. Otra cepa de *T. delbrueckii* (m30-1) mostró un comportamiento diferente, ya que sus actividades fueron menores y no presentó actividad celulasa. Por su parte, *Hanseniaspora* sp. m27-2 mostró una significativa actividad pectinolítica pero muy bajas las demás actividades polisacáridas. *C. saitoi* GM-4 y *F. capsuligenum* B-13 también presentaron las cuatro actividades enzimáticas estudiadas, y la cepa *D. vanrijae* m87-3 mostró niveles considerables de actividades pectinasa, xilanasas y celulasas, pero inferiores al de las cepas de *A. pullulans*.

TABLA 2 - Efectos de los extractos enzimáticos microbianos sobre macerados de mosto de uva cv. Malbec a baja temperatura (12°C) y a temperatura tradicional (28°C).

Cepa	Tratamiento a 28°C								Tratamiento a 12°C							
	IPT	IC	Matiz	CPT	L*	a*	b*	ΔE	IPT	IC	Matiz	CPT	L*	a*	b*	ΔE
C1	46,23	10,67	0,703	607,71	74,2	25,8	0,5	3,5	48,93	9,26	0,766	607,71	69,2	28,9	1,4	5,4
C2	51,63	9,02	0,619	740,85	74,7	23,4	3,0		50,57	8,59	0,686	740,85	74,0	28,3	-1	5,4
<i>A. pullulans</i> R-22	55,10	11,25	0,780	657,81	68,1	28,4	3,2	7,2	53,43	9,28	0,853	664,08	71,8	22,7	6	8,1
<i>A. pullulans</i> m 11-2	59,57	12,46	0,725	675,47	65,6	30,1	2,9	9,9	58,57	9,58	0,758	696,26	73,5	25,9	2,5	5,4
<i>A. pullulans</i> m 86-2	56,63	10,97	0,707	734,47	68,3	31,9	1,1	8,5	57,43	8,74	0,778	711,55	74,1	25,7	2	5,9
<i>A. pullulans</i> m 86-1	55,30	10,93	0,674	704,16	68,3	26,3	3,7	6,7	54,47	9,45	0,725	698,90	74,4	23,8	3	7,5
<i>Candida</i> sp. m 89-1	46,90	12,76	0,765	629,01	65,8	29,4	2,6	9,4	47,87	8,37	0,715	627,50	72,3	25,1	3,5	5,3
<i>C. saitoi</i> GM-4	48,70	12,35	0,795	682,61	67,8	27,3	4,5	7,7	48,27	12,39	0,783	679,23	72,5	23,0	5,1	7,7
<i>D. hansenii</i> m 50	46,43	10,53	0,654	668,84	65,1	34,2	1	12,4	51,13	10,33	0,695	670,09	71,9	24,5	3,4	5,5
<i>D. vanrijiae</i> m 87-3	53,43	11,96	0,698	693,89	66,3	31,6	2,2	9,9	53,73	9,32	0,738	694,26	74,1	24,4	3	6,8
<i>F.capsuligenum</i> B-13	56,53	10,69	0,796	588,68	65,3	29,5	3,9	10,2	56,77	10,14	0,854	597,94	65,6	29,2	4,3	4,6
<i>Hanseniaspora</i> sp. m27-2	57,67	12,09	0,738	689,38	66,1	29	3,7	9,3	54,50	7,54	0,784	689,38	79,1	19,7	2,8	13,6
<i>H. uvarum</i> m 82	48,57	10,67	0,730	615,23	69,3	29,1	2	6,1	55,67	8,77	0,763	603,71	72,6	26,0	3,2	4,8
<i>M. pulcherrima</i> m 18	46,63	10,71	0,762	669,34	66,7	30,8	2	9,1	47,33	8,70	0,763	668,58	72,3	24,4	3,8	6,0
<i>M. pulcherrima</i> ts-1	51,57	10,26	0,742	646,54	66,5	32,7	1,2	10,4	48,77	9,37	0,719	630,26	73,3	25,2	3,2	5,8
<i>M. pulcherrima</i> ts-2	48,27	12,28	0,645	632,76	59,7	29,9	4,8	15,7	46,70	9,55	0,730	633,51	71,4	28,6	1,9	2,3
<i>P. guillermondii</i> m 28-1	53,37	11,42	0,814	617,98	76,5	19,8	4,8	7,7	51,57	9,81	0,856	614,73	76,6	20,0	4,4	12,0
<i>R. dairenensis</i> GM-15	56,60	11,09	0,729	651,30	66,9	29,1	3,2	8,5	54,50	9,20	0,880	658,94	71,8	23,7	4,8	6,7
<i>S. cerevisiae</i> B-17	54,33	11,92	0,775	656,31	69,5	26,9	3,7	5,8	48,53	9,99	0,848	665,58	72,4	23,0	4,9	7,6
<i>S. cerevisiae</i> m 79-1	49,13	11,24	0,679	627,75	67,5	30,1	2,3	8,2	51,13	8,73	0,858	630,26	71,9	23,2	5,2	7,4
<i>T. delbrueckii</i> m 7-2	58,97	12,01	0,721	733,34	71,6	25,8	2,5	3,3	57,57	9,15	0,767	744,11	71,8	26,3	3	4,0
<i>T. delbrueckii</i> m 30-1	47,50	10,63	0,723	615,60	68,1	28,5	2,3	6,9	46,53	8,86	0,753	610,09	75,1	23,6	3	8,1
<i>T. pretoriensis</i> m 29	46,33	10,50	0,710	655,43	66,2	30,4	2,8	9,5	46,33	8,25	0,856	652,93	68,2	28,3	3,4	2,3

C1= Control sin enzima (1 mL de buffer cítrico-citrato pH=3,8); C2= Control con enzima comercial (Extrazyme, 1 U/mL); Extractos enzimáticos crudos= 1 U/mL; IPT (Índice de Polifenoles Totales); IC (Índice de Color); CPT (Contenido de Polifenoles Totales); L* (Claridad); a* (rojo/verde); b* (amarillo/azul); ΔE (Diferencia de color).





Kits rápidos para análisis microbiológicos en alimentos



- Glifosato.
- Pesticidas.
- E. Coli.
- Salmonella.
- Listeria.
- Gluten.
- Alérgenos.
- Micotoxinas.
- Histamina.



INTERCIENCIA SA
Análisis y Control Industrial

Acompañando a nuestros exportadores



Determinación rápida de higiene en superficie, agua y microbiología





Instrumental de medición



Immunoensayo para pruebas ambientales y alimentos



Equipamiento de medición



Equipamiento de medición



Equipamiento para análisis de agua

E. Comesaña 4538 (B1702) Ciudadela - Tel.: (54 11) 4011-4610
info@interciencia.com / www.interciencia.com

TABLA 3 - Efecto de los extractos enzimáticos sobre la clarificación y filtrabilidad del mosto a baja temperatura 12°C y a temperatura tradicional de 28°C

Cepa	Filtrabilidad (s/mL)		Clarificación (T650)	
	12°C	28°C	12°C	28°C
C1	380,10 ± 0,124	388,00 ± 0,402	12,80 ± 0,258	12,90 ± 0,189
C2	210,40 ± 0,185	238,00 ± 0,366	67,50 ± 0,345	65,00 ± 0,329
<i>A. pullulans</i> R-22	250,40 ± 0,566 ^a	266,60 ± 0,141 ^a	55,40 ± 0,990 ^{kl}	48,95 ± 0,071 ^j
<i>A. pullulans</i> m11-2	256,35 ± 0,495 ^b	268,50 ± 0,707 ^a	42,56 ± 0,792 ^g	40,80 ± 0,283 ^g
<i>A. pullulans</i> m86-2	283,20 ± 0,283 ^d	354,00 ± 1,414 ⁱ	55,20 ± 0,288 ^l	53,00 ± 1,414 ^l
<i>A. pullulans</i> m86-1	296,50 ± 0,707 ^c	312,25 ± 0,354 ^c	47,95 ± 1,344 ^j	46,75 ± 0,354 ⁱ
<i>Candida</i> sp. m89-1	351,95 ± 0,212 ^k	370,50 ± 2,121 ^m	37,50 ± 0,707 ^{ef}	31,70 ± 0,212 ^{cd}
<i>C. saitoi</i> GM-4	361,00 ± 1,141 ^m	378,00 ± 1,411 ^o	48,90 ± 0,566 ⁱ	42,60 ± 0,849 ^h
<i>D. hansenii</i> m50	327,80 ± 1,311 ^h	365,45 ± 0,636 ^k	35,25 ± 0,354 ^{cd}	33,40 ± 0,566 ^{de}
<i>D. vanrijiae</i> m87-3	255,00 ± 1,441 ^b	272,50 ± 0,701 ^b	54,45 ± 0,366 ^{kl}	50,45 ± 0,336 ^{kl}
<i>F.capsuligenum</i> B-13	355,00 ± 1,440 ^l	378,25 ± 0,354 ^o	45,00 ± 0,000 ^{hi}	40,50 ± 0,782 ^g
<i>Hanseniaspora</i> sp. m27-2	264,25 ± 0,354 ^c	299,00 ± 1,451 ^d	53,45 ± 0,686 ^k	48,95 ± 1,344 ^j
<i>H. uvarum</i> m82	346,50 ± 0,850 ^j	363,00 ± 1,515 ^j	32,35 ± 0,495 ^a	29,70 ± 0,424 ^b
<i>M. pulcherrima</i> m18	368,15 ± 0,215 ^{no}	379,95 ± 0,778 ^{op}	43,10 ± 1,141 ^{gh}	34,40 ± 0,288 ^{ef}
<i>M. pulcherrima</i> ts-1	322,50 ± 1,543 ^g	375,55 ± 0,778 ⁿ	34,30 ± 0,424 ^{bc}	33,55 ± 0,663 ^{de}
<i>M. pulcherrima</i> ts-2	336,60 ± 0,849 ⁱ	340,25 ± 0,354 ^h	43,00 ± 0,000 ^g	43,50 ± 0,700 ^h
<i>P. guillermoidii</i> m28-1	379,60 ± 0,849 ^p	390,00 ± 1,440 ^f	33,00 ± 1,524 ^{ab}	30,75 ± 1,061 ^{bc}
<i>R. dairenensis</i> GM-15	282,50 ± 0,780 ^d	315,75 ± 1,603 ^f	46,35 ± 0,495 ⁱ	45,40 ± 0,566 ⁱ
<i>S. cerevisiae</i> B-17	309,20 ± 1,321 ^f	324,25 ± 0,354 ^g	46,50 ± 0,890 ^{ji}	39,45 ± 0,636 ^g
<i>S. cerevisiae</i> m79-1	335,60 ± 0,849 ⁱ	368,00 ± 1,541 ^l	36,00 ± 0,000 ^{de}	33,45 ± 0,736 ^{de}
<i>T. delbrueckii</i> m7-2	249,25 ± 1,061 ^a	271,10 ± 1,273 ^b	57,00 ± 1,450 ^m	51,60 ± 1,980 ^{kl}
<i>T. delbrueckii</i> m30-1	370,50 ± 0,800 ^o	383,75 ± 0,355 ^q	38,15 ± 0,221 ^f	36,35 ± 0,499 ^f
<i>T. pretoriensis</i> m29	366,25 ± 0,389 ⁿ	380,75 ± 1,050 ^p	33,20 ± 0,283 ^{ab}	26,05 ± 0,071 ^a

Valores promedios ± Desviación Estándar (n = 3). Diferentes letras dentro de una misma columna indica diferencia significativa (p<0,05) entre las cepas para un mismo efecto.

En la Tabla 2 se muestran los efectos de los extractos enzimáticos obtenidos a partir de las cepas seleccionadas en la maceración de mosto a dos temperaturas de ensayo y su influencia sobre los parámetros de color.

Con respecto al IPT, el valor más alto fue encontrado para la cepa *A. pullulans* m11-2 a ambas temperaturas ensayadas. En el mismo sentido, las cepas *T. delbrueckii* m7-2, *A. pullulans* m86-2 y *F. capsuligenum* B-13 presentaron también niveles significativos de dicho índice. Mientras que el mayor contenido de polifenoles totales fue para la cepa *T. delbrueckii* m7-2, seguido de todas las cepas *A. pullulans* estudiadas. A 12°C, el índice de color fue máximo para la cepa *C. saitoi* GM-4, y significativamente alto para *H. hansenii*, *F. capsuligenum* y *A. pullulans*, a excepción de m86-2 que fue la más baja del grupo. El parámetro L* fue bajo con respecto a los mayores valores de IC, y más alto que los valores del mismo a 28°C. La componente a* sólo para *F. capsuligenum* B-13 fue mayor que el control con enzima comercial. Todas las diferencias de color resultaron mayores a los valores del control

con la enzima comercial para ambas temperaturas de ensayo.

En cuanto al IPT a 28°C, la cepa *T. delbrueckii* m7-2, *Hanseniaspora* sp. m27-2 y las cepas de *A. pullulans* (m86-2, R-22 y m86-1) mostraron valores significativamente altos para este parámetro. El CPT fue máximo para m86-2 y muy cercano a m7-2, las demás cepas de *A. pullulans* también presentaron valores elevados, sin embargo, ninguna superó a la extracción de la enzima comercial. El índice de color a 28°C fue más alto para la cepa *Candida* sp. m89-1, aunque también para *M. pulcherrima* ts-2, *T. delbrueckii* m7-2 y las cepas de *A. pullulans*, todos estos superaron al IC de la enzima comercial. Un elevado IC da lugar a un color más oscuro, en este caso el valor de L* es bajo con respecto a los mayores valores de IC. En el caso de la componente a* los valores más elevados corresponden a los mayores valores del IC, lo cual indica una componente mayor de color rojo. En el caso de la componente b* los valores son bajos lo cual indica mayor participación de pigmentos azules.

Por otro lado, en la Tabla 3 se muestran los efectos de filtrabilidad y clarificación para todas las cepas a las dos temperaturas de ensayo. Por lo que se puede observar que a 12°C la cepa m7-2 mostró el menor tiempo de filtración, seguido de R-22, sin diferencias significativas entre ellas. La cepa de *A. pullulans* m11-2 también tuvo un bajo tiempo de filtrabilidad, similar a *D. vanriijae* m87-3, pero muy diferente a las otras dos cepas de *A. pullulans* en las cuales el tiempo fue más elevado. El tiempo de filtración a 28°C en todos los casos fue mayor que el del ensayo a baja temperatura. Además, en todos los casos el tiempo fue menor que el control sin enzima. A 28°C, las cepas de *A. pullulans* R-22 y m11-2 mostraron los menores tiempos, sin diferencias significativas, al igual que para m7-2 y m87-3, las cuales mostraron bajos tiempos de filtrabilidad sin diferencias significativas entre ambas. A esta temperatura hubo una diferencia más notoria entre la mayoría de las cepas. Todas las cepas con el mejor efecto a baja y alta temperatura muestran elevados valores de actividad celulasa y xilanasasa. Este efecto de disminución del tiempo de filtración podría estar relacionado a estas últimas actividades ya, según se comentó, la cepa de *T. delbruekii* m7-2 tuvo una baja actividad pectinasa pero elevadas actividades xilanólítica y celulolítica, este comportamiento también fue descrito por Escribano y col., (2017).

En cuanto a la clarificación, la formación de flóculos de pectina facilitó la producción de un sobrenadante claro con la eliminación de la parte coloidal del mosto (Cavello y col., 2016). El efecto de clarificación en el mosto tratado con el extracto enzimático de *T. delbruekii* con 1 U/ml y 6 h de incubación a 12°C fue muy eficiente, al igual que a 28°C, pero en este caso la cepa m86-2 fue ligeramente superior. Otras cepas que tuvieron un buen desempeño para este efecto y diferente a las demás, fueron *D. vanriijae* m 87-3, *A. pullulans* R-22 y m11-2, y *Hanseniaspora* sp. m27-2.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido el estudio del potencial enzimático de una selección de levaduras productoras de polisacaridasas pertenecientes a diez especies de interés enológico. Las actividades enzimáticas estudiadas fueron relacionadas con los procesos de filtrabilidad, clarificación y extracción de color en condiciones enológicas. Los resultados muestran una amplia dife-

rencia entre las especies de levaduras estudiadas, lo que indica que la selección de las cepas es de gran importancia, ya que no todas las cepas dentro de una misma especie muestran las mismas características. En este contexto, la selección de cepas de levadura con actividades polisacaridasas para su uso como una herramienta útil para producir vinos de mayor calidad, sin la adición de costosas preparaciones de enzimas comerciales, resulta de sumo interés para la industria enológica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad Nacional de Cuyo y CONICET.

REFERENCIAS

- Belda, I., Conchillo, L.B., Ruiz, J., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. (2016). Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 223, pp. 1-8.
- Cavello I., Albanesi A., Fratebianchi D., Garmedia G., Vero S., Cavalitto S. (2017). Pectinolytic yeasts from cold environments: novel findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. *Extremophiles*, 21(2), pp. 319-329.
- Fratebianchi, D., González, M., Tenorio, C., Cavalitto, S., & Ruiz-Larrea, F. (2017). Characterization and winemaking application of a novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *VITIS—Journal of Grapevine Research*, 56(2), 85-93.
- Gao Y., Anscha J. J. Zietsman, Melané A. Vivier, John P. Moore. (2019). Deconstructing Wine Grape Cell Walls with Enzymes During Winemaking: New Insights from Glycan Microarray Technology. Review. *Molecules*. DOI: 10.3390/molecules24010165.
- Martín, M.C. and Morata de Ambrosini, V.I. (2014). Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature. *International Journal of Food Science & Technology*, 49:8, 1893-1901.
- Maturano YP, Assaf M, Fabani MP, Nally MC, Jofré V, Rodríguez Assaf LA, Toro ME, Castellanos de Figueroa LI, Vazquez F. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek* 108:1239-1256.
- Merín M.G., Martín M.C., Rantsiou K., Cocolin L. & Morata de Ambrosini V.I. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 3, 815-823.
- Qian Li, Anthony M. Coffman, Lu-Kwang Ju. (2015). Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. *Enzyme and Microbial Technology* 72:42-48