

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES CELULOLÍTICA Y XILANOLÍTICA EN LEVADURAS NO-*SACCHAROMYCES* DE ORIGEN ENOLÓGICO

MATURANO Y. PAOLA¹, TORO M. EUGENIA¹, CASTELLANOS DE FIGUEROA LUCIA², VAZQUEZ FABIO¹

¹INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-FI-UNSJ. Av. San Martín 1109 (O) San Juan.

²PROIMI Av. Belgrano y Pasaje Caseros. Tucumán

RESUMEN

Una de las características más importantes de la calidad del vino es su aroma. Las celulasas y hemicelulasas degradan los polisacáridos de las paredes celulares y de esta manera pueden incrementar el aroma frutado de los vinos debido a la liberación de precursores aromáticos. Además mejora la clarificación y filtración del jugo de uva. Cabe destacar que la mayoría de los productos comerciales usados para aumentar el aroma del vino poseen altos niveles de sustancias que degradan celulosa y xilano. Según estudios previos, las levaduras que secretan enzimas celulolíticas y xilanolíticas son las pertenecientes al grupo de las “no-*Saccharomyces*”, las cuales, recientemente, suelen emplearse en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* y de esta manera combinar el potencial de las levaduras que participan en él. Objetivo: detectar cuali y cuantitativamente actividades celulolítica y xilanolítica en levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas de origen enológico. Se emplearon 45 aislamientos pertenecientes al IBT-UNSJ. La determinación cualitativa se llevó a cabo mediante detección en placa con medios inductores específicos para cada actividad. La presencia de actividad enzimática se confirmó mediante la formación de halos de degradación (Incubación: 25°C-168h). La determinación cuantitativa se realizó mediante la técnica colorimétrica DNS con sus respectivos sustratos bufferizados a dos pH: 4 y 5,3. Resultados: cualitativamente se detectaron 13 aislamientos con actividades xilanolítica y 8 celulolítica, de los cuales 3 expresaron ambas actividades. Las levaduras que mostraron resultados positivos fueron analizadas cuantitativamente y en todos los casos se registraron valores menores a pH 4. En la actividad xilanolítica la producción enzimática fue entre 0,26 y 3,68 nkat/ml y en la celulolítica 0,17 y 1,49 nkat/ml. Conclusión: Los resultados obtenidos sugieren que las levaduras ensayadas pueden realizar un aporte positivo en cuanto a la degradación de polímeros presentes en el mosto, posibilitando su empleo en la formulación de cultivos mixtos.

Palabras claves: levaduras no-*Saccharomyces*, actividad celulolítica, actividad xilanolítica



ABSTRACT

The *bouquet* is one of the most important characteristics of the wine quality. Polysaccharides of cell walls are degraded by cellulases and hemicellulases, and so they can increase the fruity *bouquet* of wines due to the liberation of aromatic precursors. The most of commercial products used to increase the *bouquet* of wines have high levels of substances that degrade cellulose and xylan. In previous studies, the yeasts that belong to “non-*Saccharomyces*” group secrete cellulolytic and xylanolytic enzymes. Recently, there were used mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in order to combine the potential of the yeasts. **Objective:** to detect qualitatively and quantitatively cellulolytic and xylanolytic activities in indigenous non-*Saccharomyces* yeasts from enological origin. There were used 45 isolations belonging to IBT-UNSJ. Qualitative determinations were conducted by plate detection using specific inducing media for both activities. Positive enzymatic activity was confirmed by the formation of degraded halos (25°C - 168 h). Quantitative determinations were carried out by colorimetric DNS technique with buffer substrates using two pH's values: 4.00 and 5.3. **Results:** Qualitatively, there were detected 13 isolations that expressed xylanolytic activity and 8 isolations with cellulolytic activity; three of them, showed both activities. The yeasts that expressed positive results were quantitatively analyzed and in all the cases there were registered lesser values at pH 4.00. The enzymatic production of xylanases was between 1,3 and 3,7 nkat/ml and the production of cellulases was between 0,17 and 1,97 nkat/ml. **Conclusion:** The results suggest that analyzed yeast isolations can realize a positive contribution to the degradation of polymers present in the must. These yeasts could be used in the formulation of mixed cultures.

Key words: non-*Saccharomyces* yeasts, cellulolytic activity, xylanolytic activity

1. INTRODUCCIÓN

Puede describirse a la fermentación vinica como el producto de la acción de un cultivo mixto de microorganismos que involucra tanto a levaduras del género *Saccharomyces*, como a otros géneros (no-*Saccharomyces*), que contribuyen a los caracteres organolépticos del vino (Bisson & Kunkee, 1991). Actualmente se ha reevaluado la función de las levaduras no-*Saccharomyces* en el proceso de vinificación. Su presencia y permanencia en fermentaciones inoculadas y no inoculadas está bien documentada, de la misma forma que su contribución a las características analíticas y sensoriales del vino, pudiendo emplearse en co-cultivos con *S. cerevisiae* para mejorar la calidad del vino (Ciani, *et al.*, 2006; Holm Hansen *et al.*, 2001; Toro & Vazquez, 2002; Perez-Nevado *et al.*, 2006).

Una de las características más importantes de la calidad del vino es su aroma. Las celulasas y hemicelulasas degradan los polisacáridos de las paredes celulares de la piel y la pulpa de la uva y, de esta manera, pueden incrementar el aroma frutado de los vinos debido a la liberación de precursores aromáticos (Ganga *et al.*, 2001). Además, este grupo de enzimas ayuda a una mejor clarificación y filtración del jugo de uva (Haltrich *et al.*, 1997).

Cabe destacar que la mayoría de los productos comerciales usados para aumentar el aroma del vino poseen altos niveles de sustancias que degradan celulosa y xilano. Generalmente, el uso de enzimas en enología se restringe a preparaciones comerciales aisladas a partir de hongos filamentosos (Bhat, 2000). Una alternativa a esta propuesta es la implementación de cultivos mixtos con



levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (estas, según estudios previos, son capaces de secretar enzimas celulolíticas y xilanolíticas) y de esta manera combinar el potencial de las levaduras que participan en el vino (Fleet, 2003, García *et al.*, 2002; Zohre & Erten, 2002).

En este contexto, el estudio de levaduras poseedoras de actividades enzimáticas que contribuyen tanto a la calidad como a la eficiencia del proceso de fermentación enológica, resulta relevante.

El objetivo de este estudio fue evaluar actividades celulolítica y xilanolítica en levaduras no-*Saccharomyces* autóctonas de origen enológico con el fin de establecer su potencial en la formulación de cultivos iniciadores mixtos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos

Se emplearon 45 aislamientos de levaduras no-*Saccharomyces* obtenidos de ambientes enológicos pertenecientes al Instituto de Biotecnología-UNSJ (Tabla 1).

2.2 Medios de cultivo

2.2.1- Conservación y multiplicación: YEPD (g l⁻¹): extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20 (agar 20 cuando fue necesario) pH 4,5.

2.2.2- Detección cualitativa actividad celulolítica: YEPD -agar + 0,4% CMC (carboximetil celulosa) (Strauss *et al.*, 2001) pH 4 y 6,5.

2.2.3- Detección cualitativa actividad xilanolítica (g l⁻¹): YNB sin aminoácidos, 6,7; asparagina, 2; KH₂PO₄, 5; agar, 20; 4- *O*-metil glucuronoxilano de madera de abedul, 2 (Lee *et al.* 1986) pH 4 y 6,5.

2.2.4- Inductor de celulasas (g l⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 3; KH₂PO₄, 2; Extracto de levadura, 1; CMC, 10 (Vallejo *et al.*, 2004) pH 4,5.

2.2.5- Inductor de xilanasas (g l⁻¹): MgSO₄ 7 H₂O, 0,5; Ca (NO₃)₂, 0,5; KH₂PO₄, 0,5; Extracto de levadura, 1, trazas de FeSO₄ 7H₂O; 4- *O*-metil glucuronoxilano de madera de abedul, 10 (Vallejo *et al.*, 2004) pH 4,5.

2.2.6- Sustrato para cuantificación de celulasas (g l⁻¹): CMC, 10 en buffer citrato-Na 0,05M (Vallejo *et al.*, 2004).pH 4 y 5,3.

2.2.7- Sustrato para cuantificación de xilanasas (g l⁻¹): 4- *O*-metil glucuronoxilano de madera de abedul, 10 en buffer citrato-Na 0,05M (Vallejo *et al.*, 2004).pH 4 y 5,3.

Desarrollo experimental

2.3 Detección de actividades celulolíticas y xilanolíticas

Los microorganismos en estudio se activaron en medio YEPD líquido (2.2.1) durante 24 h, a 25°C y con agitación orbital (250 rpm). Se centrifugaron (12000 G 15 min) y lavaron dos veces con agua destilada estéril, se descartó el sobrenadante y sembró en los medios específicos (2.2.2 y 2.2.3). Se incubaron a 25°C, durante 168h.

Transcurrido el periodo de incubación, las placas con desarrollo de colonias se lavaron con agua destilada y posteriormente se tiñeron con solución Rojo Congo 0,2%. Se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el colorante excedente y se lavaron las placas 2 veces durante 5 minutos con NaCl 0,5M. La presencia de actividad enzimática se confirmó mediante la formación de halos de degradación alrededor de las colonias sobre los medios teñidos con la solución de Rojo Congo (Strauss *et al.*, 2001).

2.4 Determinación de actividades celulolíticas y xilanolíticas

Los microorganismos se activaron en medio YEPD líquido (2.2.1) durante 24h. Luego se inocularon en el medio inductor para cada actividad específica (2.2.4 y 2.2.5) y se incubaron con agitación continua (250rpm) a 30°C, durante 72 h (Vallejo *et al.*, 2004). Se centrifugaron (12000 G 15 min). El sobrenadante se utilizó



para las mediciones enzimáticas. Los valores de biomasa se obtuvieron por peso seco (80°C) (Buzzini & Martini, 2002).

Para las cuantificaciones enzimáticas, se midió azúcares reductores liberados mediante la técnica colorimétrica de DNS (Miller *et al.*, 1960). Se emplearon glucosa y xilosa como estándares de la actividad celulolítica y xilanolítica respectivamente. Las actividades enzimáticas fueron expresadas en nkal ml⁻¹ de solución enzimática no diluida, considerando un nkal como la cantidad de azúcar reductor liberado por μ mol de sustrato por segundo (Bailey *et al.*, 1992).

2.5 Análisis estadístico

Se llevó a cabo el Análisis de la varianza (ANAVA) unifactorial (Test de Tukey) mediante la aplicación del programa Infostat Profesional 2002 (versión 1.1) con el propósito de establecer diferencias significativas entre las 2 condiciones de pH ensayadas en las determinaciones cuantitativas. Se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$).

Cada ensayo se realizó por triplicado en forma independiente y los resultados expuestos a continuación representan el valor medio de dichas determinaciones con sus correspondientes desviaciones estándares (\pm S. D.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Detección de actividades celulolíticas y xilanolíticas

El objetivo de este ensayo fue detectar la presencia de enzimas xilanolíticas y celulolíticas secretadas por las levaduras en estudio mediante la formación de halos de degradación en sustratos específicos.

En la Figura 1 se observa el halo de degradación formado por una colonia de levaduras sobre el medio específico para detección de celulasas, teñido con la solución de rojo congo.

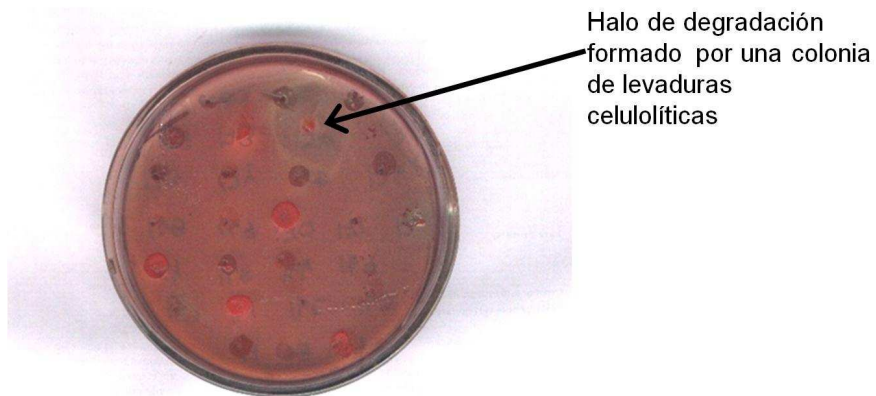


Figura 1: Screening de aislamientos de levadura para la detección de actividad celulolítica.



Especies	Nº de aislamientos	AX	AX	AC	AC
		4	6,5	4	6,5
<i>Dekkera anomala</i>	2	-	-	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	1	-	1	-	-
<i>Pichia guillermondii</i>	1	-	-	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	1	-	-	-	-
<i>Candida sake</i>	6	-	2	-	1
<i>Candida diversa</i>	1	-	1	-	1
<i>Candida steatolytica</i>	1	-	-	-	1
<i>Candida intermedia</i>	2	-	-	-	1
<i>Candida stellata</i>	1	-	-	-	-
<i>Candida cantarellii</i>	1	-	-	-	-
<i>Candida catenulata</i>	2	-	-	-	-
<i>Candida apis</i>	1	-	-	-	1
<i>Candida rugosa</i>	1	-	-	-	1
<i>Candida quercitrusa</i>	1	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	3	-	2	-	1
<i>Candida famata</i>	5	-	2	-	1
<i>Candida coliculosa</i>	2	-	-	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	2	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora vineae</i>	2	-	1	-	-
<i>Hanseniaspora osmophyla</i>	1	-	1	-	-
<i>Zigosaccharomyces bailli</i>	1	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5	-	1	-	-
<i>Debaryomyces vanriijiae</i>	3	-	2	-	-
Nº total de aislamientos	45				
Aislamientos positivos		-	13	-	8
% aislamientos positivos			28,88		17,77

Tabla 1: Perfiles de actividad xilanolítica (AX) y celulolítica (AC) de aislamientos de levaduras enológicas a dos valores de pH: 4,0 y 6,5.

Los valores de pH empleados en los ensayos fueron: 6,5: demostrado como óptimo para la detección enzimática en placa (González *et al.*, 2004) y 4: valor aproximado encontrado en el inicio de las fermentaciones vínicas (Charoenchai *et al.*, 1998; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

En los trabajos de González *et al.* (2004) y Buzzini & Martini (2002), no se detectaron actividades celulolíticas ni xilanolíticas en las levaduras analizadas. Sin embargo, en este trabajo, de los 45 aislamientos evaluados (pertenecientes a 23 especies), se encontraron 8 levaduras con actividad celulolítica y 13 xilanolítica en el ensayo a pH 6,5. No se obtuvieron resultados positivos cuando el mismo ensayo se realizó a pH 4. De todos los aislamientos ensayados, *C. diversa* BCd372, *C. parapsilosis* BCp203 y *C. famata* BCf568 poseen ambas actividades enzimáticas. De acuerdo con los resultados consignados en la **Tabla 1**, todos los aislamientos con actividad celulolítica pertenecen al género *Candida*, lo cual concuerda con los estudios realizados por Strauss *et al.* (2001).

La formación de halos de degradación por enzimas xilanolíticas estuvo asociado a levaduras de las especies *P. fermentans*, *C. sake*, *C. diversa*, *C. parapsilosis*, *C. famata*, *H. vineae*, *H. osmophila*, *D. hansenii* y *D. vanriijiae* (**Tabla 1**). Existen



antecedentes sobre actividad xilanolítica en levaduras del género *Pichia*, también encontrado en este trabajo, y otros Ascomicetes (Brennan *et al.*, 2004).

3.2 Determinación de actividades celulolíticas y xilanolíticas

La cuantificación de la actividad celulolítica, y de la misma forma la xilanolítica, se llevó a cabo bajo dos condiciones de pH: 4 y 5,3 (comprobado como el óptimo para la producción enzimática) (Bailey *et al.*, 1992), en aquellos aislamientos que mostraron actividad positiva en el ensayo cualitativo con medios con celulosa y xilano como fuente de carbono.

Como se observa en la **Tabla 2**, la producción de biomasa microbiana y la actividad celulolítica no mostraron correlación positiva ni negativa. *C. apis* BCa53, registró los mayores valores de biomasa ($0,0048 \text{ g ml}^{-1}$), aunque no los mayores valores de actividad celulolítica.

Especies	Biomasa (g ml^{-1})	Actividad celulolítica (nkat ml^{-1})	
		pH 4	pH 5,3
<i>Candida sake</i> BCs262	$0,0033 \pm 0,00016$	$0,443 \pm 0,019$	$0,932 \pm 0,06$
<i>Candida apis</i> BCa53	$0,0048 \pm 0,00067$	$0,46 \pm 0,027$	$1,013 \pm 0,028$
<i>Candida diversa</i> BCd372	$0,0042 \pm 0,00025$	$0,702 \pm 0,037$	$0,846 \pm 0,042$
<i>Candida steatolytica</i> BCs455	$0,0037 \pm 0,00033$	$0,685 \pm 0,032$	$1,266 \pm 0,045$
<i>Candida parapsilosis</i> BCp203	$0,0033 \pm 0,000066$	$0,414 \pm 0,016$	$1,036 \pm 0,046$
<i>Candida famata</i> BCf568	$0,0037 \pm 0,00018$	$0,287 \pm 0,014$	$0,794 \pm 0,031$
<i>Candida rugosa</i> BCr57	$0,0037 \pm 0,0004$	$0,172 \pm 0,006$	$0,909 \pm 0,034$
<i>Candida intermedia</i> BCr204	$0,0031 \pm 0,0003$	$0,616 \pm 0,027$	$1,497 \pm 0,059$

Tabla 2: Evaluación de la biomasa producida (g ml^{-1}) y actividad celulolítica generada (nkat ml^{-1}) a pH 4 y 5,3 por los aislamientos de levaduras con actividad celulolítica.

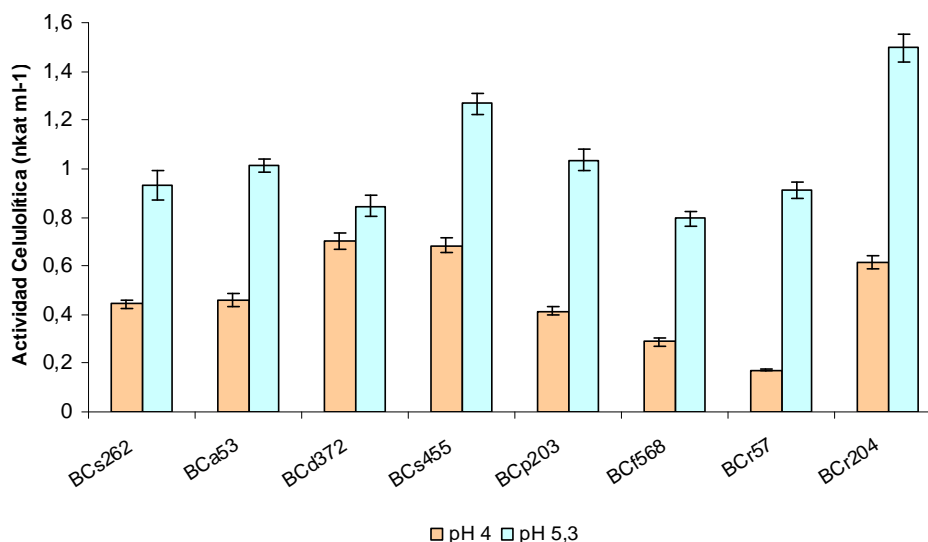


Figura 2: Comparación entre los valores de actividad celulolítica de los aislamientos de levadura bajo las dos condiciones de pH ensayadas



Se aplicó ANAVA unifactorial a los valores obtenidos para cada una de las especies bajo las 2 condiciones de pH ensayadas, indicando que en todos los casos existieron diferencias significativas entre ambas condiciones ($p \leq 0,05$) (Figura 2).

Para el caso de los aislamientos con actividad xilanolítica tampoco pudo establecerse una correlación entre la producción de biomasa y las determinaciones de la actividad enzimática.

Especies	Biomasa (g ml^{-1})	Actividad xilanolítica (nkat ml^{-1})	
		pH 4	pH 5,3
<i>Candida parapsillosis</i> BCp272	0,002 \pm 0,0001 0,0024	0,68 \pm 0,032	1,819 \pm 0,09
<i>Debaryomyces vanrijiae</i> BDV72	\pm 0,000096	1,784 \pm 0,058	2,267 \pm 0,083
<i>Candida famata</i> BCf340	0,0026 \pm 0,00016	0,31 \pm 0,016	1,326 \pm 0,037
<i>Hanseniaspora vineae</i> BHv438	0,0024 \pm 0,00016	0,655 \pm 0,039	1,557 \pm 0,065
<i>Candida diversa</i> BCd372	0,0017 \pm 0,00006	0,261 \pm 0,011	1,838 \pm 0,091
<i>Debaryomyces hansenii</i> BDh1	0,0017 \pm 0,00015 0,0017	0,571 \pm 0,016	1,281 \pm 0,056
<i>Pichia fermentans</i> BPf417	\pm 0,000049	0,34 \pm 0,018	0,729 \pm 0,021
<i>Debaryomyces vanrijiae</i> BDV566	0,0024 \pm 0,00012	0,414 \pm 0,019	1,266 \pm 0,031
<i>Candida famata</i> BCf568	0,0033 \pm 0,00018	1,059 \pm 0,042	1,089 \pm 0,054
<i>Debaryomyces hansenii</i> BDh558	0,0017 \pm 0,00017	2,632 \pm 0,092	3,44 \pm 0,11
<i>Candida sake</i> BCs376	0,0013 \pm 0,00005	0,655 \pm 0,032	2,282 \pm 0,022
<i>Candida parapsillosis</i> BCp203	0,0017 \pm 0,00009	0,33 \pm 0,008	0,626 \pm 0,03
<i>Candida sake</i> BCs403	0,0013 \pm 0,00009	3,514 \pm 0,14	3,687 \pm 0,099

Tabla 3: Evaluación de la biomasa producida (g ml^{-1}) y actividad xilanolítica generada (nKat ml^{-1}) a pH 4 y 5,3 por los aislamientos de levadura con actividad xilanolítica.

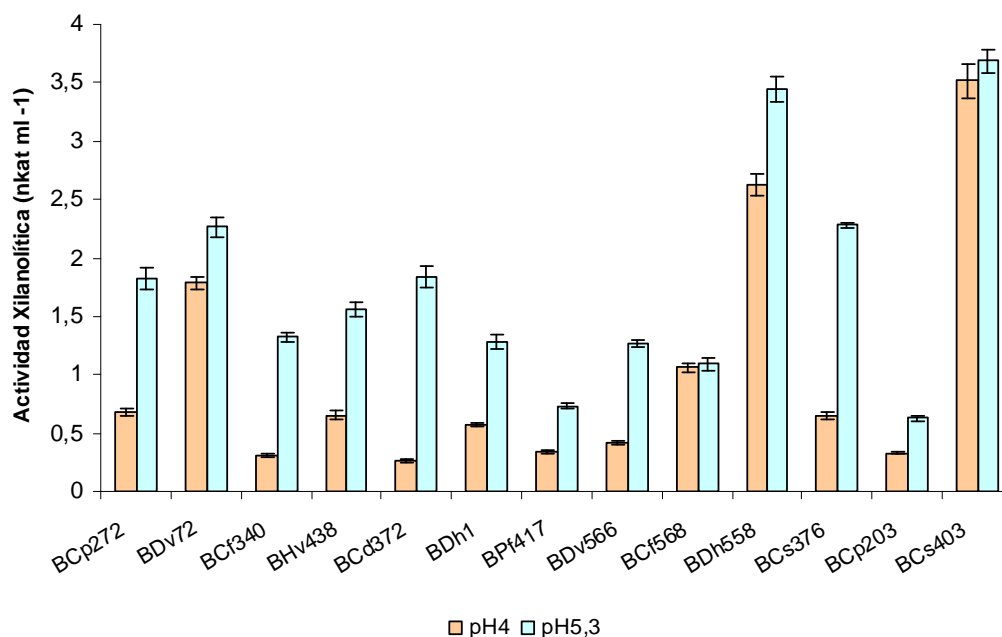


Figura 3: Comparación entre los valores de actividad celulolítica de los aislamientos de levadura bajo las dos condiciones de pH ensayadas.



Los análisis estadísticos de los datos de actividad xilanolítica bajo las dos condiciones de pH ensayadas indicaron que, en la mayoría de los aislamientos existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), excepto en las especies *C. famata* BCf568 ($p=0,48$) y *C. sake* BCs403 ($p=0,15$). Este dato adquiere relevancia en cuanto a la posibilidad de empleo de estas levaduras a pH afines con el proceso enológico. Las levaduras que presentaron mayor actividad xilanolítica pertenecen a los géneros *Debaryomyces* y *Candida* (*D. hansenii* BDh558 y *C. sake* BCs403), ambos con antecedentes publicados de ensayos en forma combinada con *S. cerevisiae* para iniciar fermentaciones enológicas (García *et al.* 2002, Toro & Vazquez, 2002).

En este trabajo se detectaron 3 aislamientos con las dos actividades enzimáticas estudiadas, pertenecientes al género *Candida*. Estas también fueron cuantificadas. Desde el punto de vista enológico esto es ventajoso, ya que ambas actividades hidrolíticas pueden interactuar en la degradación de las paredes celulares. Witkowska & Piegza (2006) estudiaron la actividad xilanolítica y celulolítica de la levadura *Geotrichum candidum* para emplearla en cultivos iniciadores para malteo de cerveza. Los niveles de expresión de xilanasas y celulasas obtenidos son comparables a los resultados de este trabajo.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que las levaduras ensayadas pueden realizar un aporte positivo en cuanto a la degradación de polímeros presentes en el mosto. Estudios posteriores de las características enológicas de las levaduras posibilitará su empleo en la formulación de cultivos mixtos.

Recibido: Diciembre 2007

Aceptado: Febrero 2009

NDLR: Trabajo presentado en el "XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología", 26 al 30 de Noviembre de 2007, Mendoza, Argentina.
Si desea contactarse con alguno de sus autores, comuníquese a enologia@revistaenologia.com

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY M.J., BIELY P. & POUTANEN K. (1992). "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity". *Journal of Biotechnology*. 23:257-270.
- BHAT M. K.(2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18:355-383.
- BISSON L. & KUNKEE R. (1991). "Microbial Interactions during Wine Production". In: *Mixed Cultures in Biotechnology*. Chapter 3. Zeikus G., Johnson E. A. (Eds). Mc Graw-Hill, Inc.
- BRENNAN, Y., CALLEN W. N., CHRISTOFFERSEN L., DUPREE P., GOUBET F., HEALEY S., HERNÁNDEZ M., KELLER M., NISHA K. L., SITTENFELD A., TAMAYO G., WELLS S., HAZLEWOOD G. P., MATHUR E. J., SHORT J. M., ROBERTSON D. E. & STEER B. A. (2004). "Unusual Microbial Xylanases from Insect Guts". *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3609-3617.
- BUZZINI P. & MARTINI A. (2002). "Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments". *Journal of Applied Microbiology*. 93:1020-1025.
- CHAROENCHAI C., FLEET G.H. & HENSCHKE P.A. (1998). "Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts". *American Journal of Enology & Viticulture*. XLIX: 283- 288.



- CIANI M., BECO L. & COMITINI F. (2006). "Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations". *International Journal of Food Microbiology*. 108: 239-245.
- FLEET G. H. (2003). "Yeast interactions and wine flavour". *Int. J. Food Microbiol.* 86:11-22
- GANGA A., PIÑAGA F., QUEROL A., VALLÉS S. & RAMÓN D (2001). "Cell- wall degrading enzymes in the release of grape aroma precursors". *Food Science Technology International*. 7:83-87
- GARCIA A., CARCEL C., DULAU L., SAMSON A., AGUERA E., AGOSIN E., & GÜNATA Z. (2002) "Influence of a Mixed Culture with *Debaryomyces vanrijae* and *Saccharomyces cerevisiae* on the Volatiles of a Muscat Wine". *Journal of Food Science*. 67: 1138-1143.
- GONZALEZ J.A., GALLARDO C.S., POMBAR A., REGO P. & RODRIGUEZ L.A. (2004). "Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts". *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 3:743-750.
- HAIGHT K.G. & GUMP B.H. (1994). "The use of macerating enzymes in grape juice processing". *American Journal of Enology & Viticulture*. 45:113-116.
- HOLM HANSEN E., NISSEN P., SOMMER P. NIELSEN J.C. & ARNEBORG N. (2001). "The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Applied Microbiology*. 91: 541-547.
- LEE H., BIELY, P., LATTA, R.K., BARBOSA, M.F., & SCHNEIDER, H. (1986). "Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains". *Applied & Environmental Microbiology*. 52:320-324.
- MILLER G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
- PÉREZ-NEVADO F., ALBERGARIA H., HOGG T. & GIRIO F. (2006). "Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*". *International Journal of Food Microbiology* 108: 336-345.
- RIBÉREAU- GAYON P., DUBOURDIEU D., DONÈCHE B. & LONVAUD A. (2003). "La uva y su maduración ". En: *Tratado de Enología*, tomo 1: Microbiología del vino. Vinificaciones. Capítulo 10: 307-38 Ed Mundi- Prensa- Ed hemisferio Sur.
- ROYER J. C. & NAKAS J. P. (1990). "Interrelationship of Xylanase Induction and Cellulase Induction of *Trichoderma longibrachiatum*". *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2535-2539.
- STRAUSS M.L.A., JOLLY N.P., LAMBRECHTS M.G. & VAN RENSBURG P. (2001) "Screening for de production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts". *Journal of Applied Microbiology*. 91:182-190.
- TORO, M.E. & VAZQUEZ, F. 2002. "Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 18:347-354.
- VALLEJO HERRERA M.D., M.E. TORO, L.I.C. DE FIGUEROA & VÁZQUEZ F. (2004). "Extracellular hydrolytic enzymes produced by phytopathogenic fungi". *Environmental Microbiology. Methods and Protocols*. Spencer J.F.T. & A.L.R. de Spencer (Eds).vol:16, chapter 31. pp:299-322, Humana Press, Totowa, New Jersey. E-ISBN 1-58829-116-2.3
- WITKOWSKA D. & PIEGZA M. (2006). "Capability of *Geotrichum Candidum* Yeasts for Cellulases and Xylanases Biosynthesis". *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 9(4), #41. Available Online: <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue4/art-41.html>.
- ZOHRE D.E. & ERTEN H. (2002). "The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation". *Process Biochemistry*. 38: 319-324.