

INNOVACIÓN DE DOS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA VINIFICACIÓN: NUEVAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS Y LEVADURAS AUTÓCTONAS

MARTÍN, MARÍA CAROLINA; MORATA, VILMA INÉS



Laboratorio de Biotecnología
FCAI-UNCUYO; CONICET
San Rafael, Mendoza
mcmartin@fcai.uncu.edu.ar



EQUIPO DE TRABAJO:

Dra. Vilma Morata de Ambrosini (*Responsable del Laboratorio*)

Dra. Gabriela Merín

Ing. Raúl Carrión

Dra. Luciana Prendes

Ing. Diana Margara

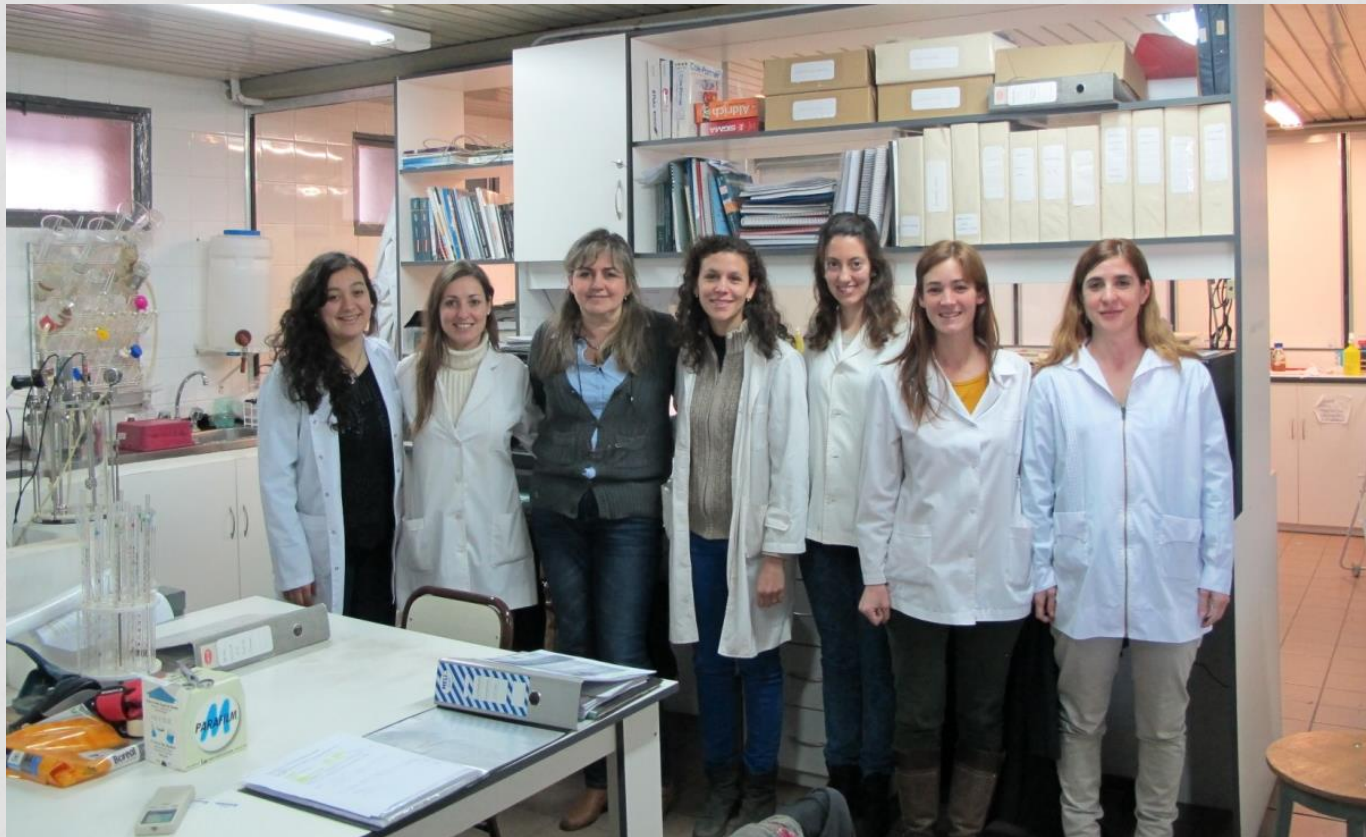
Ing. Marianela Bignert

Dra. Silvina Cabeza

Ing. Sara Longhi

Tec. Enol. Flavio Muñoz

Dra. Carolina Martín



EL COLOR DEL VINO TINTO

UNO DE LOS PRINCIPALES ATRIBUTOS DE LA CALIDAD DEL VINO...



ORIGEN DEL COLOR



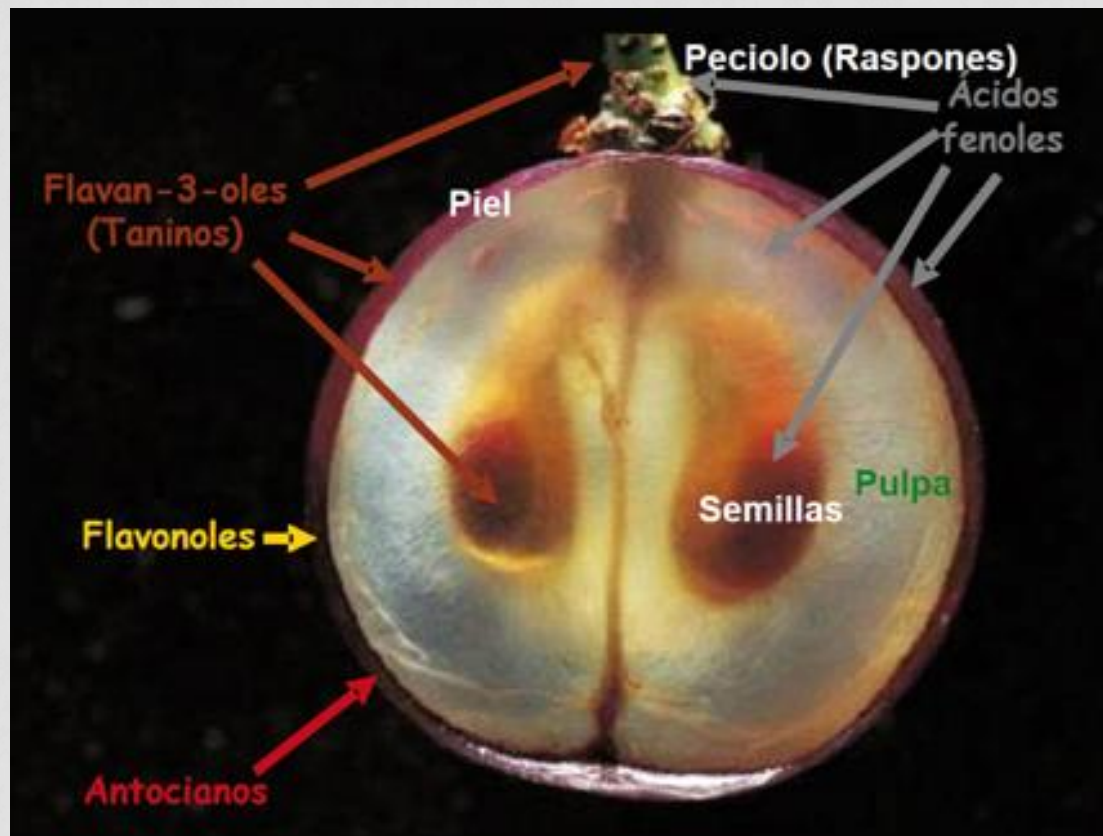
COMPUESTOS FENÓLICOS
O POLIFENOLES DE LA UVA
Y EL VINO



UN GRUPO DIVERSO Y
MUY NUMEROSO DE
COMPUESTOS
BIOACTIVOS

COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA Y EL VINO

Distribución de los principales compuestos fenólicos en la uva:



COMPUESTOS FENÓLICOS DEL VINO

Factores que intervienen en la composición fenólica de un vino:



UVA



VINIFICACIÓN

Variedad, Factores climáticos,
Prácticas vitícolas, etc.

Técnica de vinificación, Temp.,
Tiempo de maceración, Cepa
de levadura, Fermentación
maloláctica, Añejamiento, etc.

COMPUESTOS BIOACTIVOS

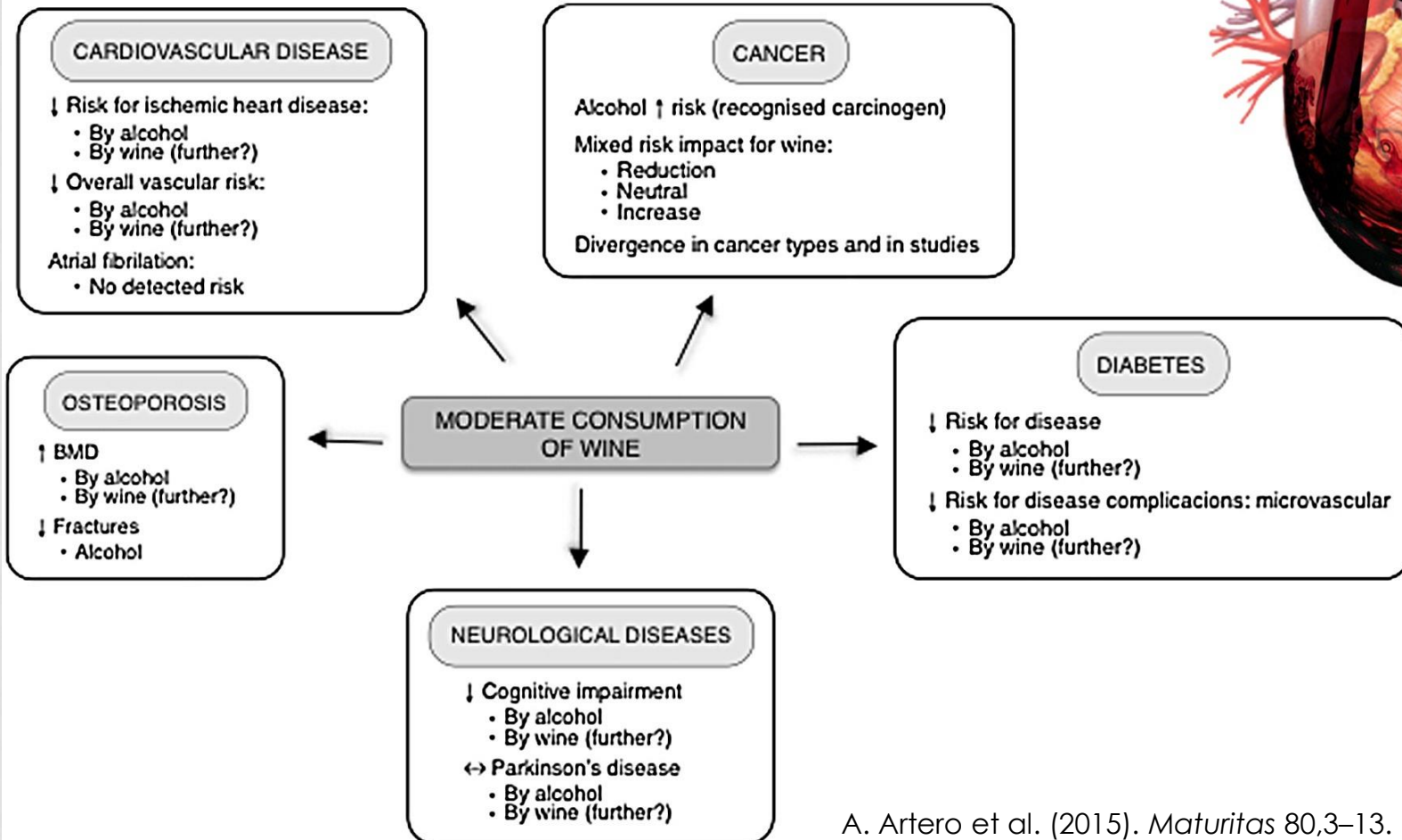
THE FRENCH PARADOX
what is the secret?



Jean vs. Joe

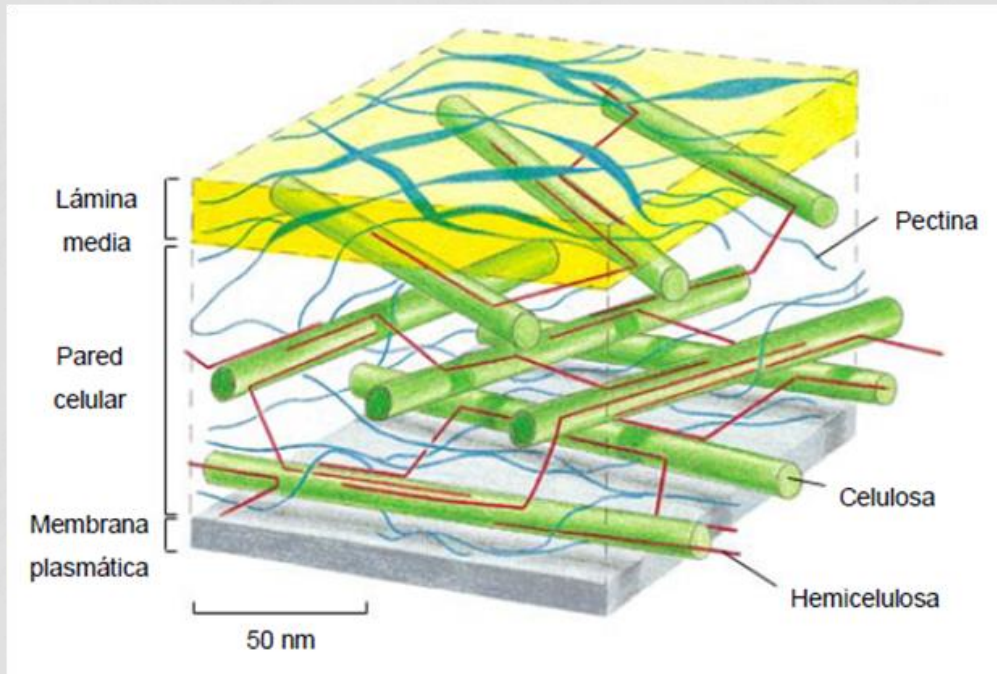
COMPUESTOS BIOACTIVOS

El impacto del consumo moderado de vino sobre la salud:





ENZIMAS DE MACERACIÓN PARA VINIFICACIÓN EN TINTO



PECTINASAS



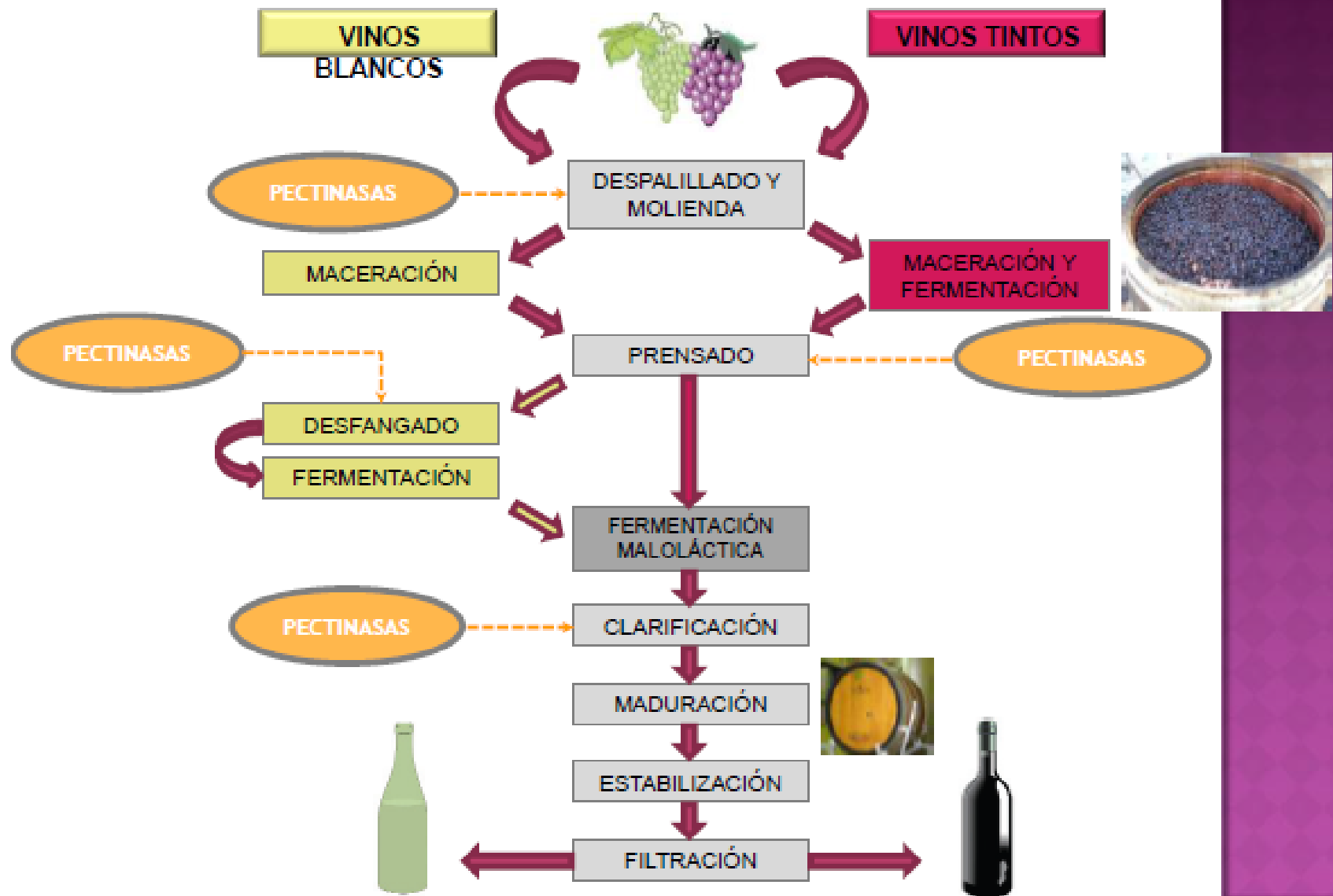
USO ENOLÓGICO

PECTINASAS ALTERNATIVAS

Fuentes microbianas
Cold-active

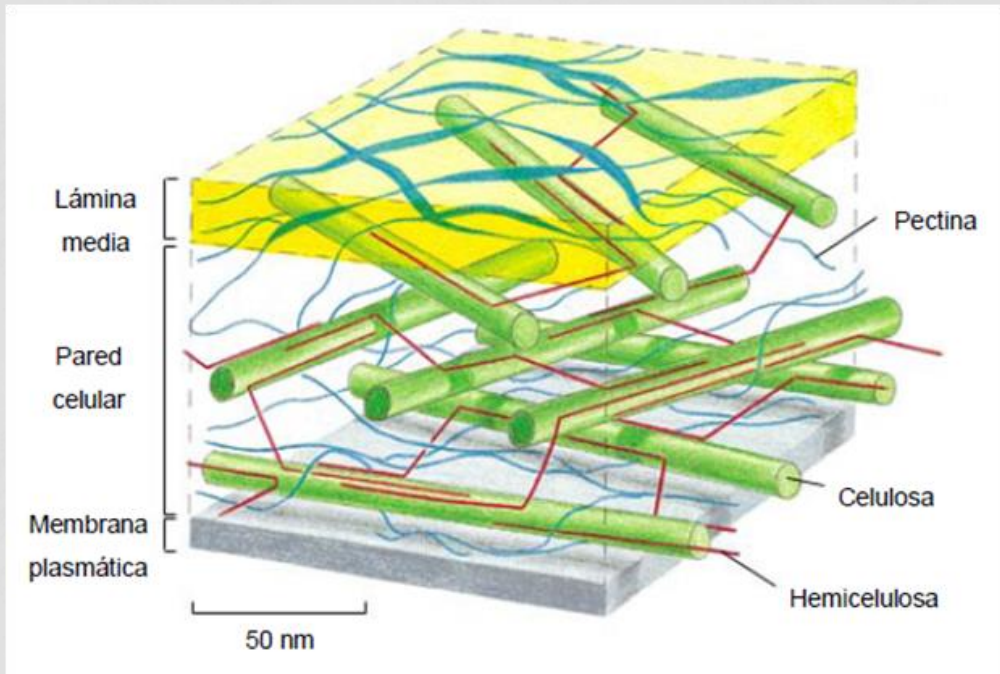
PECTINASAS EN ENOLOGÍA:

Proceso de vinificación - Uso de pectinasas





ENZIMAS DE MACERACIÓN PARA VINIFICACIÓN EN TINTO



PECTINASAS



USO ENOLÓGICO

PECTINASAS ALTERNATIVAS

Fuentes microbianas
Cold-active

TRABAJOS PREVIOS

Desarrollo de preparados enzimáticos activos a bajas temperaturas para uso enológico. Martín, María Carolina. (2012). **Tesis Doctoral.** Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.

Cold-Active Acid Pectinolytic System from Psychrotolerant *Bacillus*: Color Extraction from Red Grape Skin

María C. Martín¹ and Vilma I. Morata de Ambrosini^{2*}

Am. J. Enol. Vitic. 64:4 (2013)

International Journal of
Food Science & Technology

Institute of
Food Science
Technology **ifst**

Original article

Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature

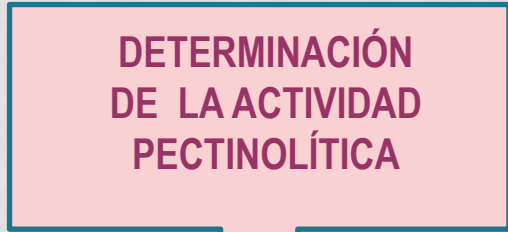
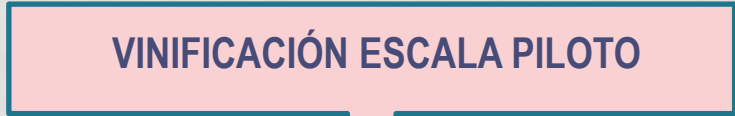
María Carolina Martín^{1,2} & Vilma Inés Morata de Ambrosini^{1,2*}

International Journal of Food Science and Technology 2014, **49**, 1893–1901

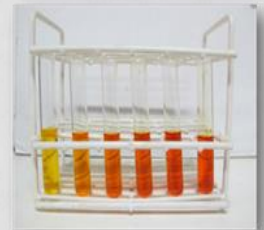
HIPÓTESIS DE TRABAJO

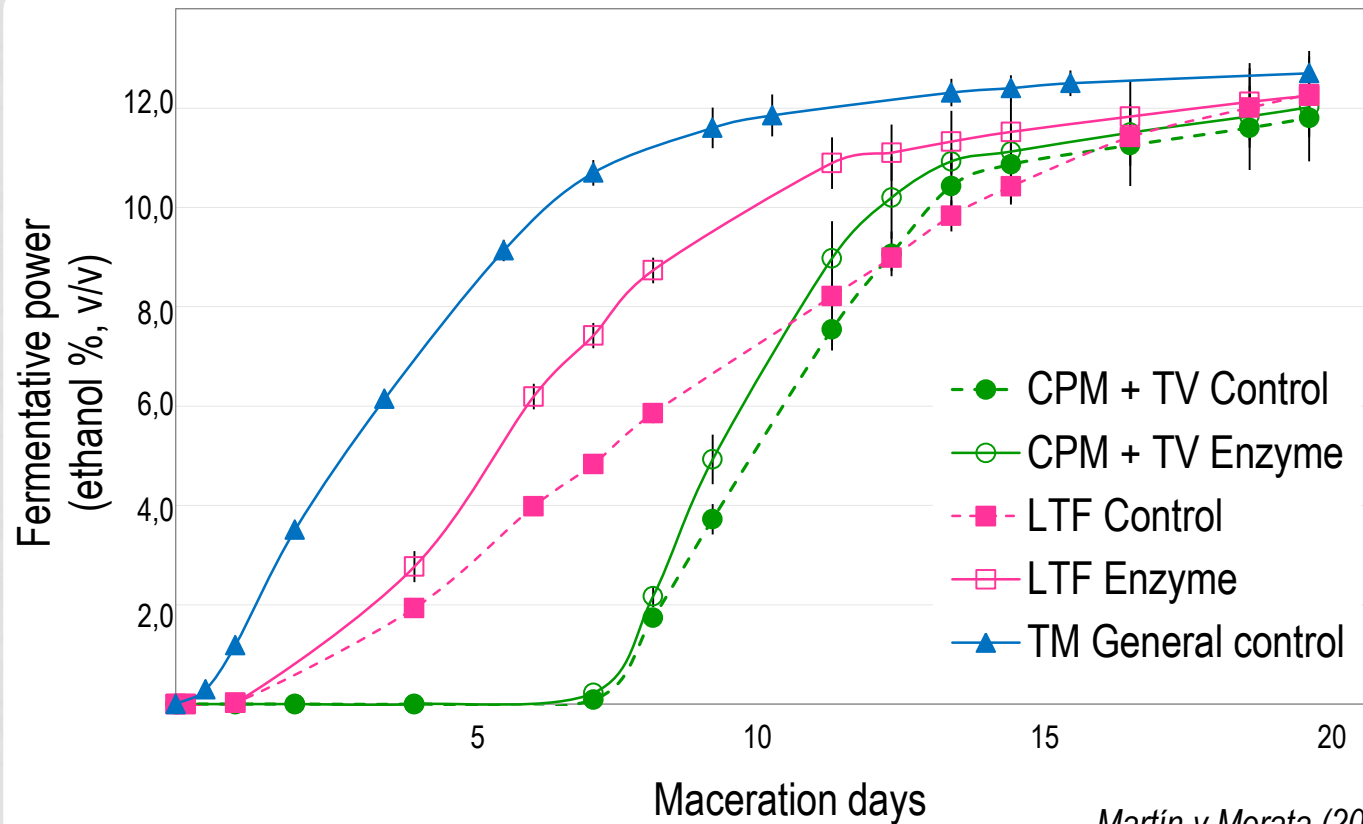
- Es posible contar con **preparados pectinolíticos activos a baja temperatura** capaces de mejorar la extracción de pigmentos, compuestos de flavor y compuestos bioactivos, los cuales podrían emplearse como **insumos enológicos**.
- Definir **protocolos de vinificación**, alternativos a la vinificación tradicional, **que utilicen bajas temperaturas de maceración y/o fermentación conjuntamente con enzimas de maceración “frío-activas”**, que permitan obtener **vinos regionales de calidad**, con un perfil distintivo, y con mayor contenido en compuestos antioxidantes.

ESCALAS DE VINIFICACIONES Y ACTIVIDAD PECTINOLÍTICA



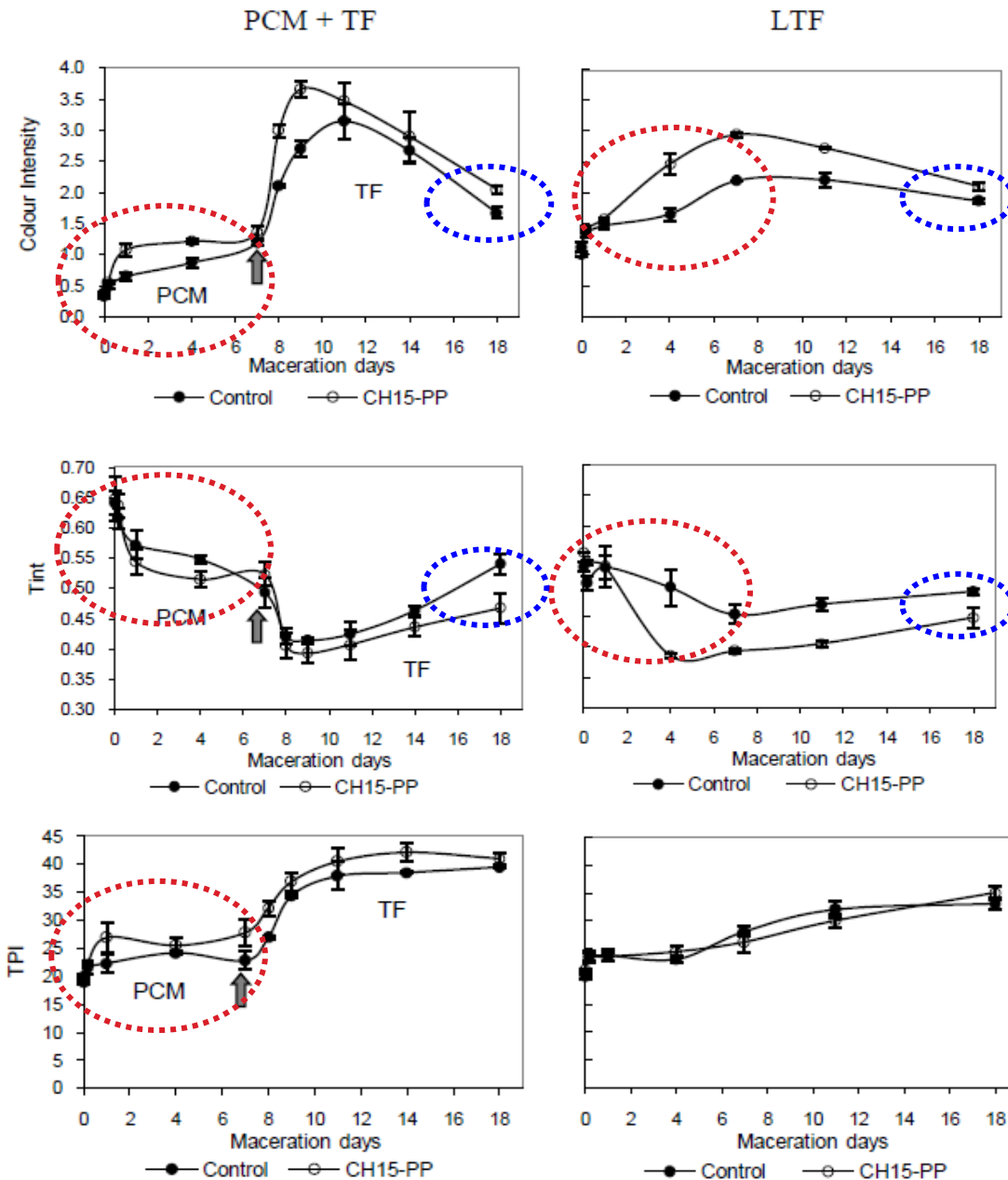
Análisis
espectrofotométrico
(Método del
reactivo DNS)





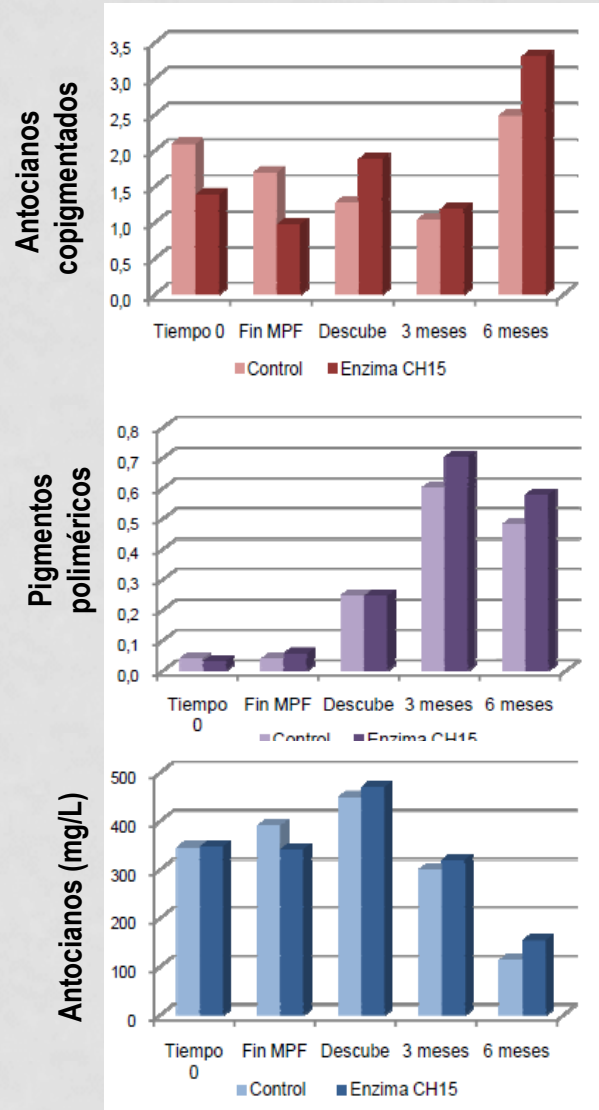
Cinética fermentativa de los vinos elaborados mediante técnicas de fermentación alternativas, y del vino obtenido tradicionalmente. (Microvinificaciones)

ANÁLISIS Y EVOLUCIÓN DEL COLOR

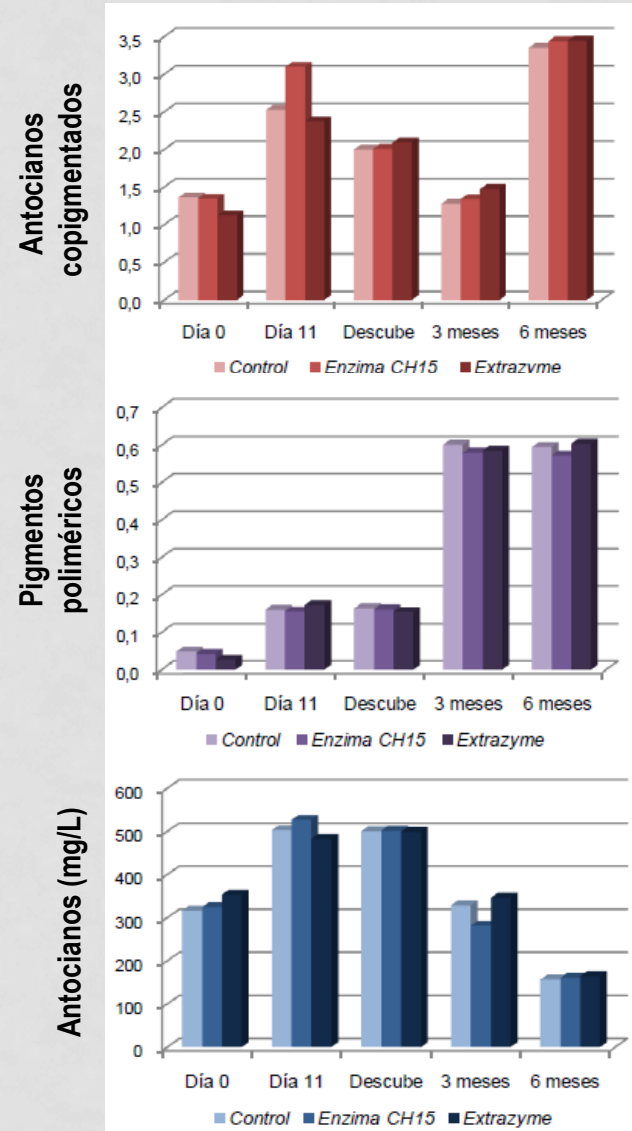


ANÁLISIS Y EVOLUCIÓN DEL COLOR

MPF (7 días - 6°C) +
Fermentación Tradicional (28°C)



(FBT)
Fermentación a 20°C



VINIFICACIÓN 2016

Escala Piloto



Molienda



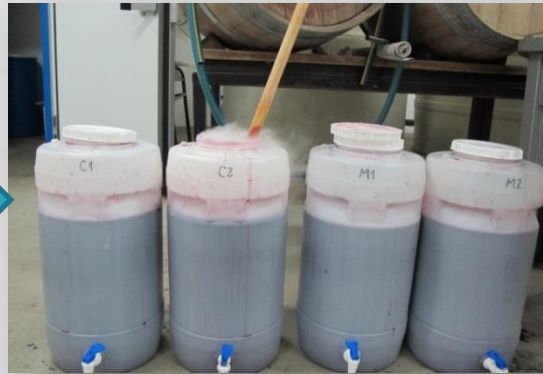
Homogeneización del mosto



Variedad:
Bonarda

VINIFICACIÓN 2016

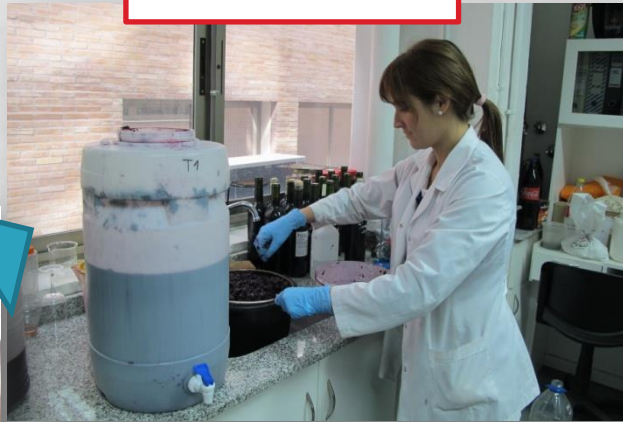
Maceración Pre-fermentativa en frío con hielo seco



Descube

Desborre

Control de fermentación



Embotellado



VINIFICACIÓN 2016

Degustaciones: Sala de Catación de la FCAI



Equipo de Planta Piloto de la FCAI y a alumnos de la TUEV



OBJETIVO

- ❑ *Estudiar el efecto de la enzima pectinolítica a mayor escala, conjuntamente con la aplicación de hielo seco (CO₂) durante la MPF en el proceso de vinificación de Bonarda.*

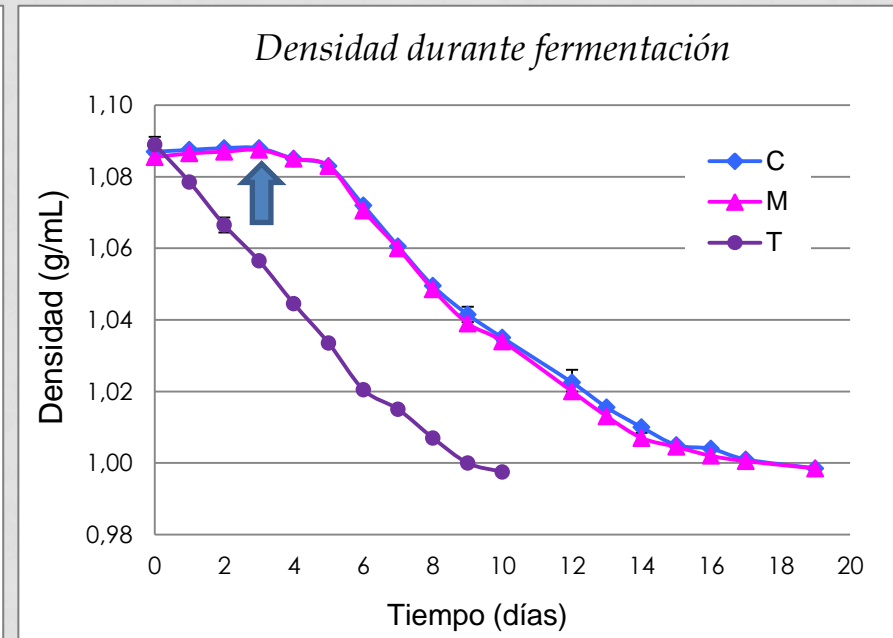
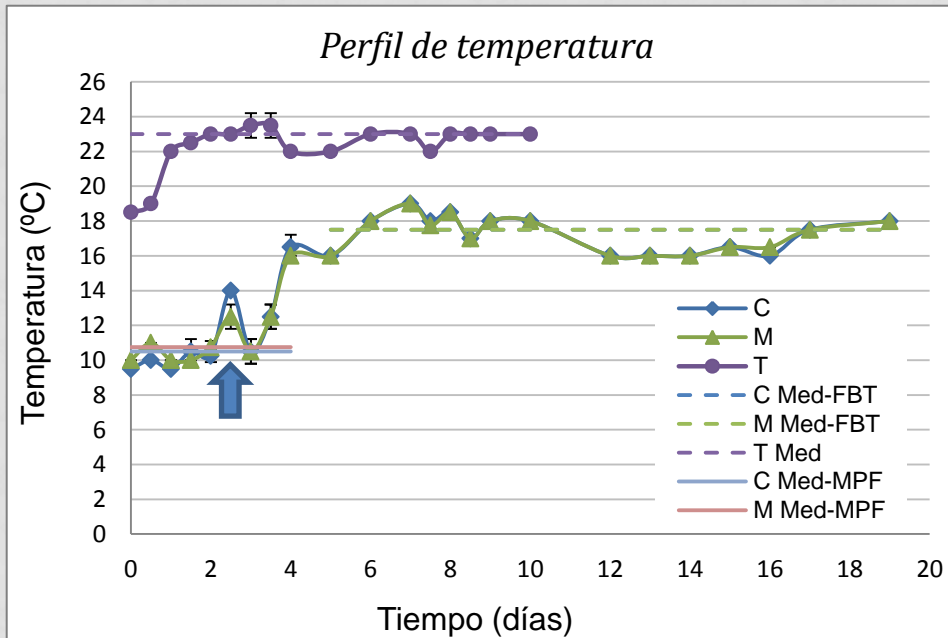
- **Microvinificaciones: Tanques de 25 L**
- **Uva cv. Bonarda**
- **LSA: *S. cerevisiae* IOC 18-2007**
- **Enzimas: Preparado pectolítico PP-CH15 *cold-active* de origen bacteriano**



Tratamientos (duplicados):

- i) **Muestra: Maceración prefermentativa en frío (MPF, 3 días-9°C) + Fermentación a baja temperatura (FBT, 20°C-14 días), con enzima CH15.**
- ii) **Control: idem Muestra, sin enzima.**
- iii) **Testigo: Fermentación tradicional a 25°C-10 días aprox.**

❖ Perfil de temperatura durante la vinificación y control de la fermentación:



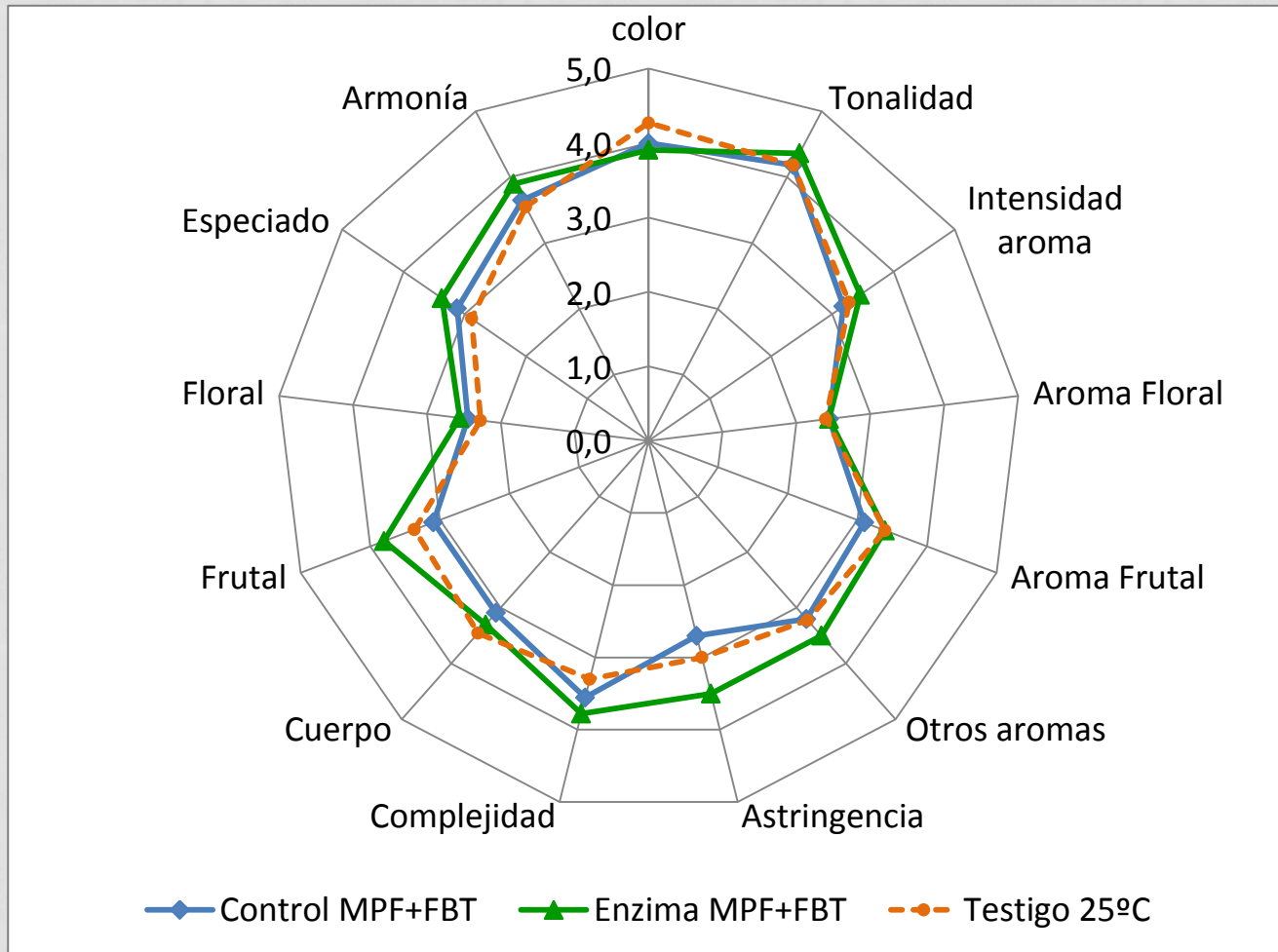
❖ Características físico-químicas y parámetros cromáticos de los vinos evaluados al final de la fermentación alcohólica:

Parámetro	MPF + FBT^o (control)	MPF + FBT^o (enzima)	FT^o (testigo)
Densidad (20°C/20°C)	0,9912 ± 0,0001	0,9916 ± 0,0002	0,9913 ± 0,0006
Alcohol (% v/v)	11,45 ± 0,07	11,45 ± 0,07	11,60 ± 0,00
pH	3,11 ± 0,02	3,19 ± 0,08	3,21 ± 0,01
Azúcares totales (g/L)	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Acidez total (g/L, ácido tartárico)	5,80 ± 0,00	5,5 ± 0,28	5,35 ± 0,49
Acidez volátil (g/L, ácido acético)	0,53 ± 0,03	0,57 ± 0,03	0,58 ± 0,04
Glicerol (g/L)	9,6 ± 0,14	9,8 ± 0,00	10,45 ± 0,35
Ácido cítrico (g/L)	0,54 ± 0,06	0,58 ± 0,03	0,64 ± 0,03
Ácido tartárico (g/L)	1,75 ± 0,14	1,81 ± 0,33	1,84 ± 0,31
Ácido málico (g/L)	1,55 ± 0,07	0,80 ± 0,99	0,25 ± 0,21
Ácido láctico (g/L)	0,14 ± 0,03	0,7 ± 0,63	1,08 ± 0,07
Intensidad Colorante	1,336 ± 0,171	1,479 ± 0,011	1,488 ± 0,029
Matiz	0,520 ± 0,002	0,532 ± 0,012	0,520 ± 0,002
IPT	35,6 ± 1,8	36,7 ± 0,4	41,7 ± 0,8
L*	63,30 ± 3,33	60,79 ± 0,42	60,68 ± 0,24
C*	39,38 ± 3,72	42,64 ± 1,07	41,96 ± 0,82
a*	39,37 ± 3,71	42,57 ± 1,07	41,82 ± 0,72
b*	0,39 ± 1,18	2,32 ± 0,06	3,39 ± 1,16
Δ E* (M/C)	-	4,50	-
Δ E* (M/T)	-	1,31	-
Antocianos Totales (mg/L)	403,4 ± 21,0	428,3 ± 55,1	523,7 ± 14,2
Pigmentos Poliméricos	2,120 ± 0,057	2,065 ± 0,007	2,200 ± 0,014
Co-pigmentos	0,900 ± 0,113	1,060 ± 0,014	1,205 ± 0,049

Los resultados son los promedios de los dos tratamientos (duplicados) ± desviación estandar (DE).

Resultados analíticos: Autoanalizador de vinos ALPHA FT-IR WineAnalyzer (BRUKER) (I.R.)

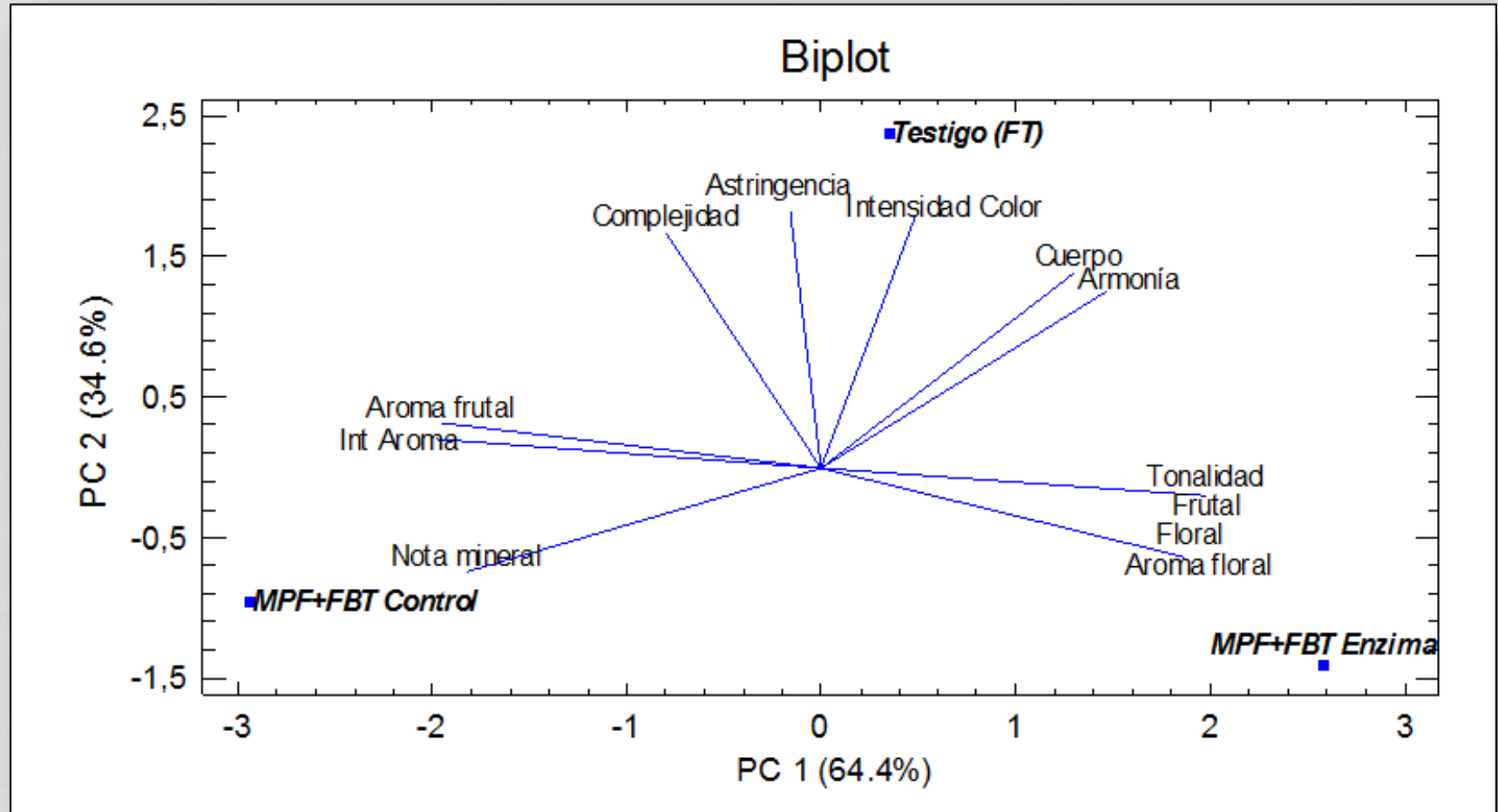
ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS VINOS



Complementación:

Servicios de análisis de perfil aromático completo y de compuestos indeseables (Servicio INV).

Análisis de Componentes Principales



INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

Trabajo en colaboración con el Dr. Mario Ninago y Dr. Marcelo Villar
FCAI; PLAPIQUI (UNS-CONICET)



C/E



S/E

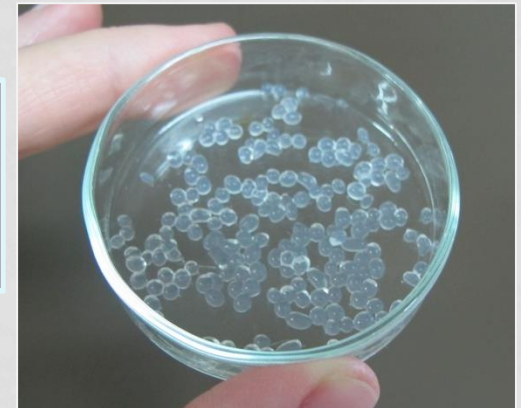
OBJETIVOS

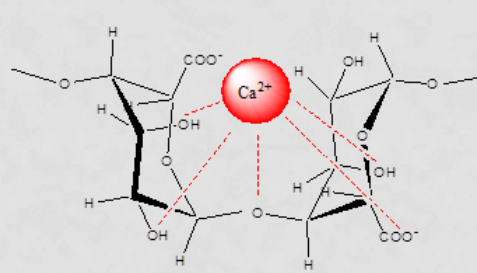
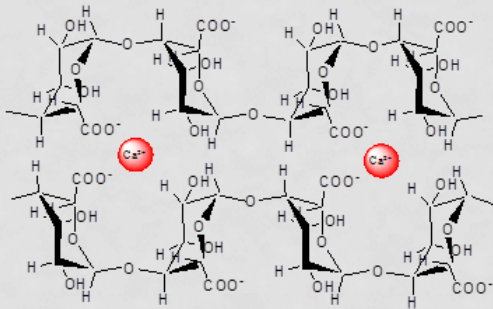
- ❑ Estudiar la inmovilización de una pectinasa enológica comercial en hidrogeles de alginato de calcio.
- ❑ Caracterizar micro-estructuralmente los biomateriales obtenidos.
- ❑ Caracterizar bioquímicamente la pectinasa inmovilizada y comparar su comportamiento con la enzima libre.

Técnica de
inmovilización



Encapsulación o
Entrampamiento en
una estructura tipo gel

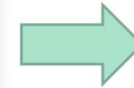




Pectinasa enológica



Algas pardas



Alginato de sodio

FORMACIÓN DEL HIDROGEL

Solución de alginato
(2 % m/v)

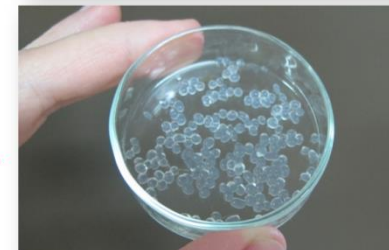
Pre-mezcla

Solución de pectinasa
(0,3 % m/v)

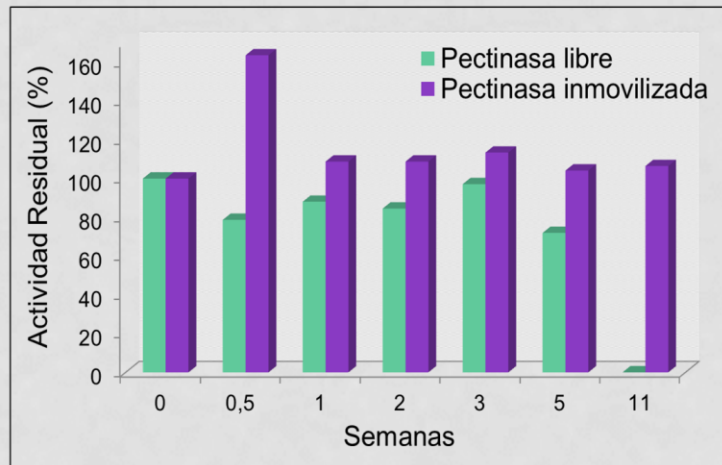
Solución de CaCl_2
(2,5 % m/v)

GELACIÓN EXTERNA

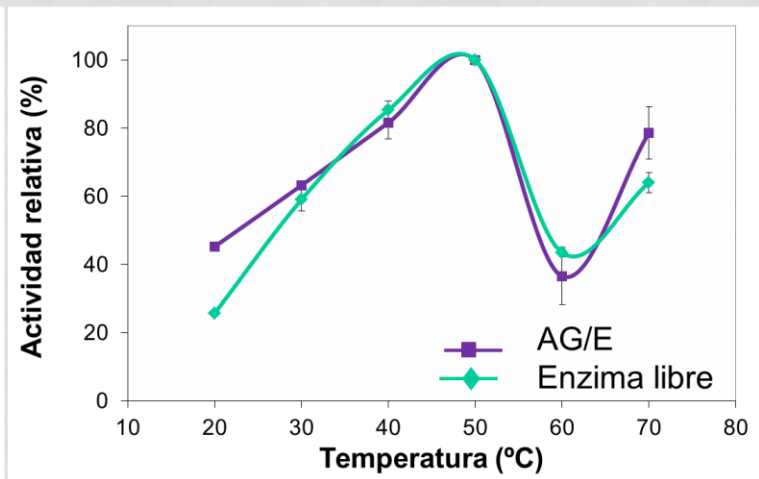
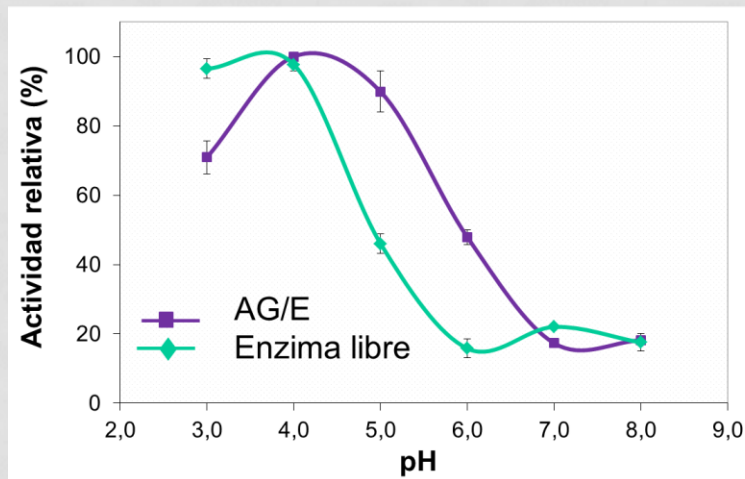
Perlas de alginato de calcio/enzima (AG/E)



ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: Efecto de la T° y del pH

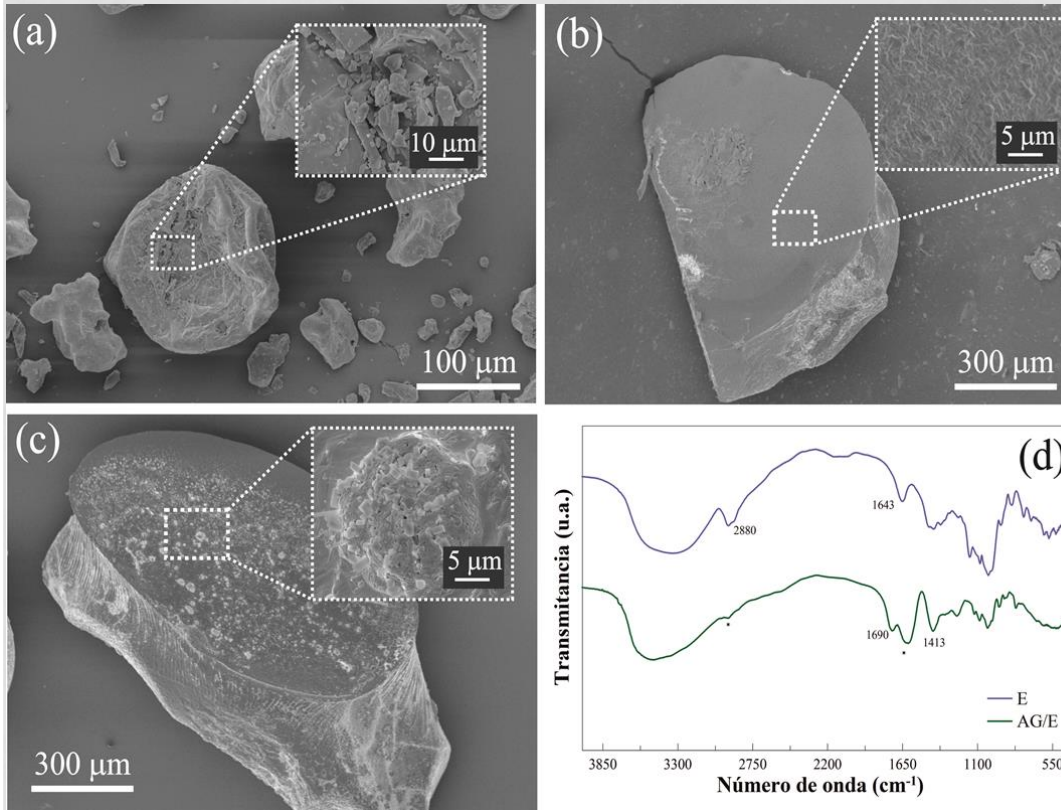


- La actividad de la pectinasa entrampada fue mayor a la de la enzima libre durante su almacenamiento en solución buffer citrato pH 3,8 a 4 °C.
- La pectinasa inmovilizada mantuvo su actividad catalítica luego de 11 semanas, a diferencia de la enzima libre

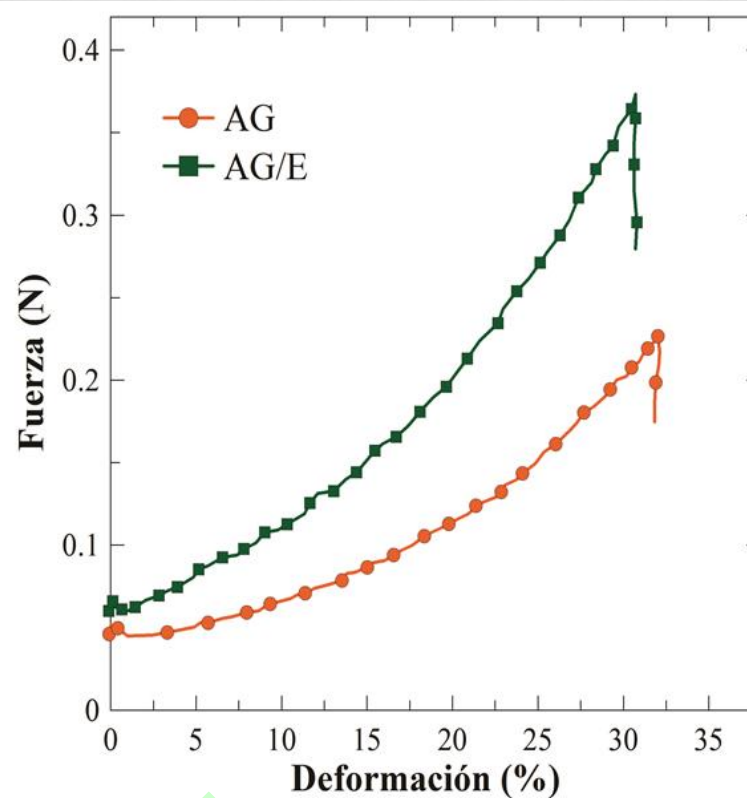
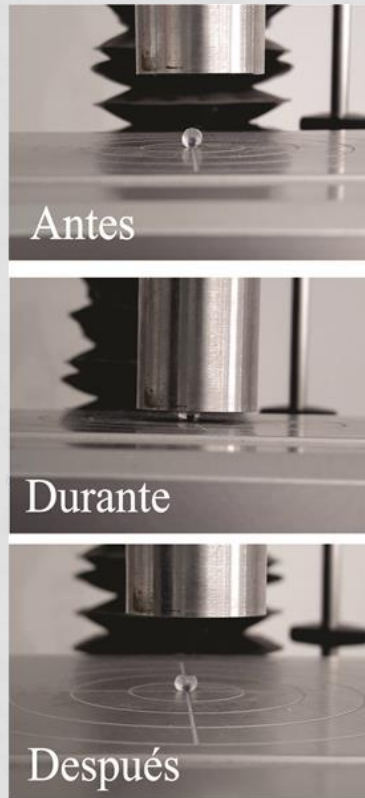


- La enzima libre mostró la máxima actividad en el rango de 3,0 a 4,0, mientras que el pH de **AG/E fue de 4,0**.
- El proceso de entrampamiento **no afectó la temperatura óptima** de trabajo de la enzima, siendo la máxima actividad para AG/E y la enzima libre de **50 °C**.

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES MECÁNICAS



- ❑ Las pectinasas mostraron una morfología pseudo-esférica y bordes irregulares (a).
- ❑ La superficie de fractura de la perla de AG mostró una superficie homogénea (b).
- ❑ Los hidrogeles compuestos (c) mostraron la presencia de aglomerados de enzima.
- ❑ El análisis FTIR confirmó la presencia de enzima en los hidrogeles de alginato^[3] (d).

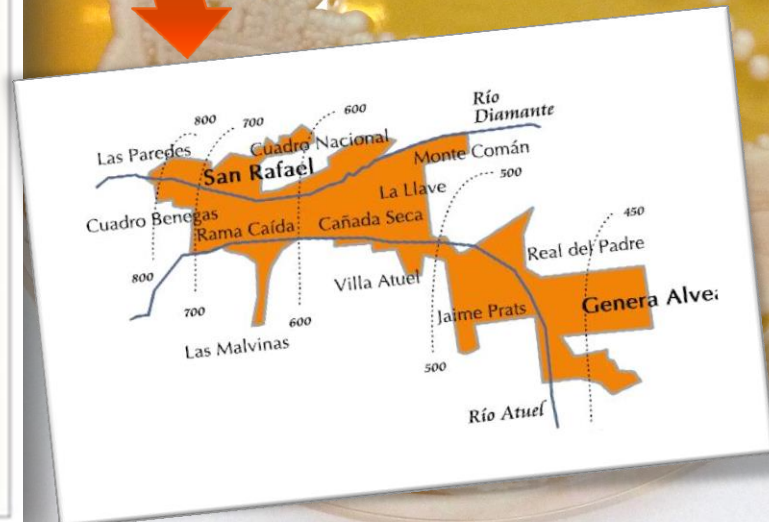
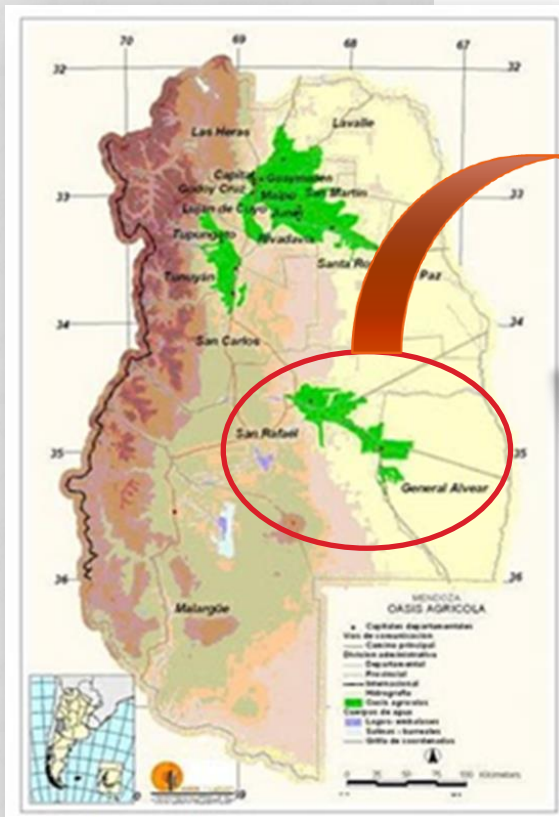


- ❑ Los ensayos de compresión revelaron que la resistencia mecánica de AG/E se incrementó un 68%, lo cual podría atribuirse a incrementos en la reticulación de las cadenas de alginato, por acción de la pectinasa.
- ❑ Los valores obtenidos resultaron similares a los reportados en la literatura.

CONCLUSIONES

- ❑ De acuerdo a los resultados obtenidos, y en concordancia con otros autores, el **alginato de calcio es un muy buen agente de entrapamiento para la pectinasa** en estudio, presentando una metodología de trabajo simple y de bajo costo, que convierte a este nuevo **material compuesto** en un potencial candidato para ser empleado como **biocatalizador** durante el **proceso de vinificación**.

LEVADURA FERMENTATIVA AUTÓCTONA DE LA D.O.C. SAN RAFAEL-MZA



PROYECTO FEDERAL DE INNOVACIÓN PRODUCTIVA (PFIP) - COFECYT (MINCYT)

«Innovación de las principales herramientas biotecnológicas para vinificación, levaduras y enzimas pectinolíticas, para la diferenciación de los vinos de la región sur de Mendoza»

Directora: Dra. Vilma Morata

UVT: Fundación de la UNCuyo

Organismo participa: CONICET

2009-2014

OBJETIVOS

- ❑ Estudiar la **ecología de las levaduras naturales de vinificación y diseñar un cultivo iniciador** para vinificación desarrollado específicamente para la región.
- ❑ Diseñar un protocolo para la obtención y vehiculización de la **levadura seca activa**, transferible a productores de insumos enológicos.
- ❑ Diseñar un **protocolo de vinificación** validado a escala piloto e industrial, transferible a bodegas de la región, que incluya el inóculo de los cultivos iniciadores desarrollados, dando lugar a la mejor expresión de los vinos de la región.
- ❑ Brindar **consultas, asesoramiento y resolución de problemas** puntuales del sector vitivinícola en la temática del presente proyecto.

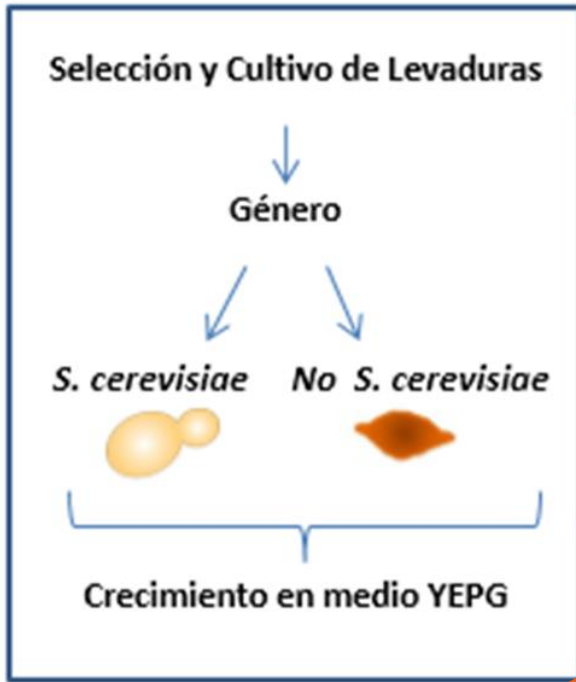
OBJETIVOS

- ❑ Estudiar la **ecología de las levaduras naturales de vinificación** y **diseñar un cultivo iniciador** para vinificación desarrollado específicamente para la región.
- ❑ Diseñar un protocolo para la obtención y vehiculización de la **levadura seca activa**, transferible a productores de insumos enológicos y/o bodegueros.
- ❑ Diseñar un **protocolo de vinificación** validado a escala piloto e industrial, transferible a bodegas de la región, que incluya el inóculo de los cultivos iniciadores desarrollados, dando lugar a la mejor expresión de los vinos de la región.
- ❑ Brindar **consultas, asesoramiento y resolución de problemas** puntuales del sector vitivinícola en la temática del presente proyecto.

Téc. Enol. Flavio Muñoz
Becario CIN

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Diseñar un protocolo de preparación de levaduras secas activas (LSA) mediante **liofilización** utilizando diferentes agentes lioprotectores.
- ✓ Comparar el proceso de liofilización con el método de **secado convencional a baja temperatura**.
- ✓ Evaluar el efecto de diferentes **sustancias protectoras** de secado en la viabilidad celular de *Saccharomyces cerevisiae*.



Soluciones Lioprotectoras

Liofilización
-36°C; 0,022
mm Hg; 8 h



Solución Lioprotectora

Secado convencional
a baja temperatura
(32°C)



(Sc 13A-21) (NoS 8A-5)

24 h de incubación, 28° C

Lavado

Soluciones
Lioprotectoras

- Glutamato de sodio 2,4%
- Extracto de levadura 4%
- Fructosa 10%, glucosa 10%
- Leche descremada 10%
- Mosto de uva 18°Bx (Bonarda)

LIOFILIZACIÓN

(Sc 13A-21)

24 h de incubación, 28° C

Lavado

Solución
Lioprotectora

Mosto de uva
18°Bx (Bonarda)

Secado en Estufa
de Vacío

Resistencia de Microorganismos

Fraciones
de 300 µL

Procesos

Liofilización
(-40°C/72 h)

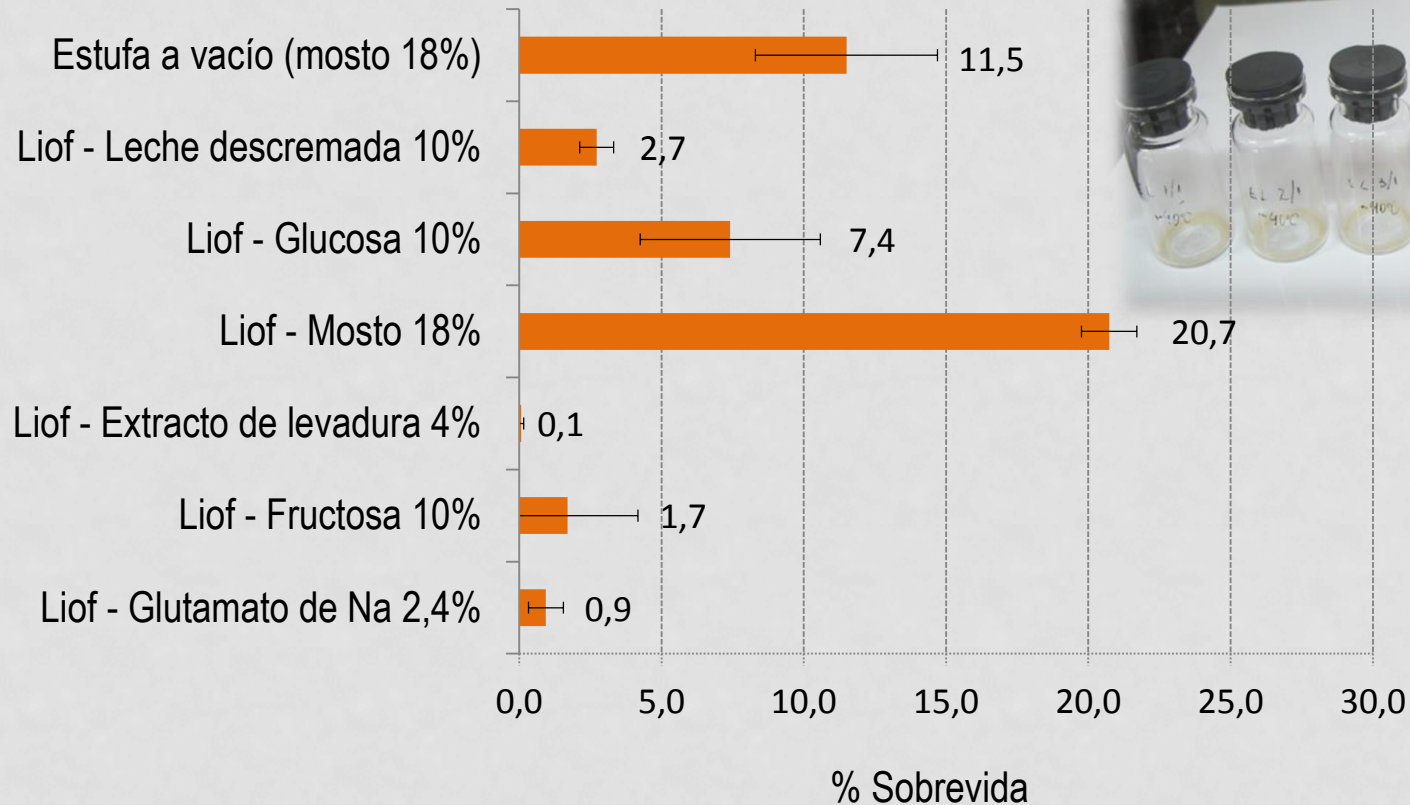
Secado Vacío
(32°C/6 h)

Factor de
Sobrevida

$$FS_t = 1 - \frac{UFC_0 - UFC_t}{UFC_0}$$

UFC/mL
(Inicial)

UFC/mL
(Final)



Porcentaje de sobrevida(FS) de la cepa *S. cerevisiae* 13A-21 liofilizada en distintos lioprotectores y secada a vacío (32°C).

Porcentaje de sobrevida(FS) de la cepa **No-Saccharomyces 8A-5** liofilizada:

Glutamato de Na 2,4% (lioprotector) = **96,0%**

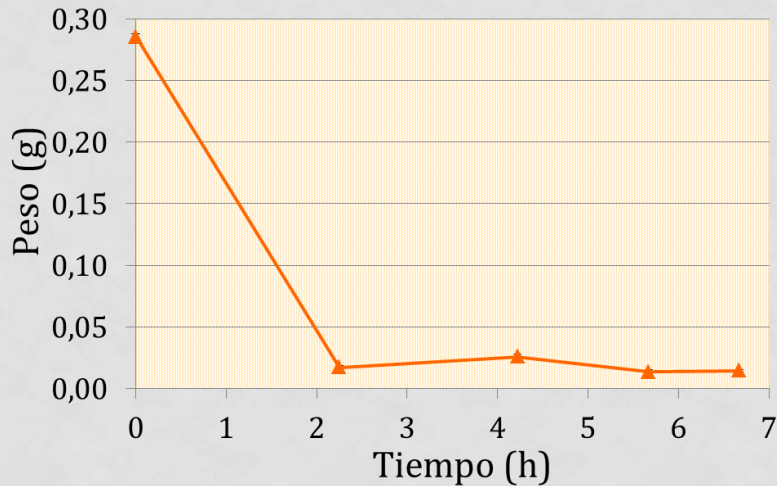
Recuentos de células viables (UFC/mL) antes y después del proceso de liofilización/secado en estufa a vacío, en diferentes lioprotectores.

Agente protector (Liofilización)	Recuento inicial (UFC/mL)	Recuento final (UFC/mL)
Glutamato de Na 2,4%	$1,00 \times 10^9$	$9,50 \times 10^6$
Fructosa 10%	$1,05 \times 10^9$	$1,76 \times 10^7$
Mosto de uva	$3,14 \times 10^9$	$1,01 \times 10^8$
Extracto levadura 4%	$2,33 \times 10^9$	$1,76 \times 10^6$
Glucosa 10%	$1,19 \times 10^9$	$9,20 \times 10^7$
Leche descremada 10%	$1,67 \times 10^9$	$4,58 \times 10^7$
<i>Estufa a vacío:</i>		
Mosto de uva	$2,06 \times 10^9$	$2,36 \times 10^8$

Res. OIV-OENO 576A-2017:

Define levadura seca activa (LSA): 92% de materia seca como mínimo y un nivel de levaduras igual o superior a 10^{10} UFC/g de materia seca.

Otros estudios:



Cinética del secado térmico en estufa a vacío (32°C) de *S. cerevisiae* 13A-21.

- ✓ Efecto del tiempo y la velocidad de congelamiento

***S. cerevisiae*:
especie freeze-sensitive**

- ✓ Curva de supervivencia (a 3-4 meses)
- ✓ Escalar la producción de LSA...
- ✓ Evaluación del poder fermentativo de las levaduras secas

CONCLUSIONES

- ❑ Para la cepa no sacaromycética, el mejor protocolo de producción de LSA resulta ser la **liofilización** empleando **glutamato de sodio** como agente protector, garantizando una casi total sobrevivencia luego de dicho proceso.
- ❑ Para *S. cerevisiae* 13A-21, la elaboración de un cultivo iniciador sería conveniente tanto mediante **liofilización** en presencia de **mosto de uva acondicionado** como lioprotector, o el **secado en estufa de vacío a baja temperatura**, utilizando el mismo soporte.
- ❑ Estas metodologías garantizarían la mejor forma de preservar y mantener activa esta importante cepa fermentativa para su uso en vinificación.

MUCHAS GRACIAS
POR LA ATENCIÓN!!