

13TCA - APLICACIÓN DE UNA PREPARACIÓN PECTINOLÍTICA DE *Aspergillus sojae* EN LA ELABORACIÓN DE VINO BLANCO

FRATEBIANCHI DE LA PARRA, D¹.; CAVALITTO, S¹; RUIZ-LARREA, F².

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CINDEFI (UNLP-CONICET).

²Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Logroño, La Rioja, España.
E-mail: dantefratebianchi@gmail.com.

Resumen

Se estudió el efecto del un preparado pectinolítico de *Aspergillus sojae* (PP-AS) en la elaboración de vinos blancos. Se adicionó PP-AS al mosto de uva blanca para estudiar el efecto clarificante del mismo durante el desfangado (proceso de “limpieza” del mosto antes de fermentar), y posteriormente se utilizaron los mostos desfangados para elaborar vinos blancos secos y analizar su composición química final desde el punto de vista enológico. Un gramo de PP-AS presentó igual número unidades de actividad pectinolítica, determinada sobre pectina en condiciones similares a las utilizadas durante el desfangado (pH 3,5 y 20° C), que un preparado comercial utilizado como testigo en los ensayos. Según los resultados obtenidos, los mostos tratados con PP-AS disminuyeron su turbidez significativamente respecto a los mostos control, y hasta valores considerados óptimos (100-250 NTU) para su posterior uso en la elaboración de vinos blancos de calidad. Los vinos blancos elaborados con PP-AS exhibieron un mayor contenido de ácido L-málico y un menor contenido de ácido L-láctico respecto a los vinos elaborados sin enzimas, efectos buscados en la elaboración ciertos tipos de vinos blancos secos.

Introducción

La vinificación en blanco se denomina a toda vinificación en la que sólo interviene la fase líquida, sin hollejos, pudiéndose realizar este tipo de elaboración con otras uvas que no sean blancas para poder obtener así otros tipos de vinos. La elaboración de un vino blanco joven incluye varias etapas. Una vez llegado el momento de la vendimia, la uva es transportada entera hacia la bodega para evitar oxidaciones, y favorecer la obtención de un color pálido en el vino blanco. Generalmente luego se realiza el despalillado y prensado de las uvas. Durante el prensado se liberan los azúcares contenidos en la pulpa, así como los polifenoles localizados en la piel y las semillas de las uvas, y los polisacáridos estructurales (celulosas, hemicelulosas, y pectinas). Este mosto contiene sólidos de diverso origen y macromoléculas en solución, y que influyen en la turbidez del jugo; particularmente las sustancias pécticas cumplen un rol importante en la turbidez del mismo (Ribereau-Gayon et al., 2006). El desfangado estático consiste en la clarificación del mosto por sedimentación de sólidos suspendidos, de composición esencialmente vegetal, por acción de la gravedad. Un mosto desfangado mejora la calidad organoléptica del vino blanco, al inducir a las levaduras a la formación de una menor concentración de alcoholes superiores y ácidos grasos volátiles (Flanzy, 2000), y a una mayor concentración de acetatos de alcoholes superiores y ésteres de ácidos grasos (Ribereau-Gayon et al., 2006). Durante el proceso, la carga microbiana disminuye sensiblemente, por lo que los mostos clarificados son menos proclives de sufrir fermentaciones indeseadas.

Las enzimas pectinolíticas son capaces de degradar los polímeros de pectina de la pared celular de las plantas, por lo que se utilizan para disminuir la viscosidad del mosto de uva blanca y acelerar e incrementar el grado de sedimentación durante el desfangado. *Aspergillus sojae* ATCC 20235 es un hongo filamentoso que produce elevada actividad pectinolítica, e hidroliza ácido poligalacturónico a valores de pH cercanos a 3,0.

Objetivos

Se estudió el efecto clarificante de una preparación pectinolítica de *A. sojae* al ser agregado al mosto de uva blanca durante el desfangado, y se lo comparó con el efecto clarificante de un preparado pectinolítico comercial normalmente utilizado en enología, y con un control sin el agregado de enzimas.

Se elaboraron vinos blancos a partir de los mostos obtenidos y se analizó la composición química final de los mismos desde el punto de vista enológico.

Metodología

Se emplearon dos preparaciones enzimáticas con actividad pectinolítica en la elaboración de vino blanco: un preparado pectinolítico obtenido de *Aspergillus sojae* ATCC 20235 (de ahora en adelante simplemente PP-AS), y el preparado comercial Lallzyme C-max de la casa Lallemand S.A.

PP-AS se obtuvo a partir de cultivos sumergidos de *A. sojae* realizados con sulfato de amonio y cáscara de naranja pulverizada como fuente única de carbono. Finalizados los cultivos, el micelio y los restos sólidos se separaron del medio de cultivo mediante centrifugación (6000 rpm por 20 minutos) seguida de filtración del sobrenadante por tela muselina. Luego el sobrenadante se refiltró a través de filtros de nitrato de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro, se concentró mediante la utilización de un cartucho de flujo tangencial (Sartorius®, 10.000 MWCO), y se lavó con cinco volúmenes de buffer cítrico/fosfórico pH 5,0 por diafiltración, utilizando el mismo cartucho. El concentrado resultante, denominado PP-AS se liofilizó y se conservó a 4° C hasta su utilización.

Se estudió la actividad pectinolítica tanto de PP-AS como de Lallzyme C-max. Los preparados se resuspendieron por separado en agua miliQ, de forma tal de obtener una solución de 0,1 g/ml de cada uno. Por un lado se determinó actividad poligalacturonasa a 35° C y pH 5,0, utilizando como sustrato ácido poligalacturónico. Por otro lado, con el fin de asemejar las condiciones de reacción a las que acontecen durante la elaboración de vinos, se determinó actividad polimetilgalacturonasa a 20° C y pH 3,5, utilizando pectina de manzana como sustrato. En ambos casos, las actividades enzimáticas se determinaron siguiendo el incremento de grupos reductores por colorimetría utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959). Los sustratos utilizados se prepararon al 0,2% p/v en buffer acético/acetato 20mM al pH correspondiente, la relación enzima/sustrato fue 1:10 volúmenes, y el tiempo de ensayo 10 minutos. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de ácido galacturónico por minuto, en las condiciones de reacción dadas.

Tipo de uva utilizada y ensayos de desfangado.

Se utilizó uva blanca (*Vitis vinifera*) variedad Viura, proveniente de La Rioja, España. Un total de 65 kg de uvas se despalilló manualmente, y posteriormente se sometió a un ciclo de prensado suave utilizando una prensa neumática. El mosto obtenido se recibió en un depósito de 100 litros, e inmediatamente después se suplementó con 92 mg/L de metabusulfito de potasio (MBS). Tanto el desfangado como las microvinificaciones se realizaron en recipientes cilíndricos de vidrio de 3,8 litros de capacidad, con boca amplia y tapa a rosca, esta última perforada en el centro para la inserción de una válvula tipo “airlock”, que permite la salida de CO₂ del sistema y restringe el ingreso de aire.

El mosto se repartió equitativamente en cada uno de los recipientes, llenados a tope de capacidad, y se utilizó para realizar ensayos de desfangado con enzimas. Se realizaron cuatro tratamientos distintos:

- Adición de Lallzyme C-max (Lallemand S.A.) a razón de 0,114 g / 3,8 L mosto (3 g / hL mosto) (L).
- Adición de PP-AS en dos cantidades diferentes:
 - 0,02 g / 3,8 L mosto (AS 1).
 - 0,01 g / 3,8 L mosto al inicio de la maceración + refuerzo de PP-AS a las 16 horas, dejando 0,04 g / 3,8 L mosto hasta el final del ensayo (AS 2).
- Control sin agregado de enzimas (C).

Los tratamientos de maceración se realizaron por cuadruplicado durante 38 horas en cuartos a temperatura controlada entre 18 y 22° C. El efecto de las enzimas en la clarificación del mosto a lo largo de la maceración se registró mediante determinaciones periódicas de turbidez utilizando un turbidímetro. El índice de turbidez se expresó como NTU (Unidad de Turbidez Nefelométrica), que es el valor correspondiente a la intensidad de la luz desviada por una suspensión estándar de formazina, a un ángulo de 90° con respecto a la radiación incidente. Finalizados los ensayos se procedió al desfangado, para lo cual el sobrenadante de los recipientes se trasegó en forma separada a cuatro depósitos de 15 litros, uno por cada tipo de mosto (L, AS1, AS2, C), eliminando así las lías presentes en los recipientes. Para el caso de los mostos L y AS1, se ajustó la turbidez a 200 NTU con sus respectivas lías provenientes del desfangado.

El mosto contenido en cada uno de los cuatro depósitos se repartió equitativamente en tres recipientes cilíndricos de 3,8 litros a razón de tres litros por recipiente, y posteriormente cada recipiente se inoculó con levaduras seleccionadas (Lalvin 71B de Lallemand S. A.) a una concentración de 30 gramos de levadura seca por cada 100 litros de mosto. De este modo, se elaboraron vinos blancos por triplicado, con mostos producto de cuatro tratamientos distintos (C, L, AS1, AS2). Las fermentaciones se llevaron a cabo en cuartos a temperatura controlada entre 18 y 20° C. El progreso de la fermentación alcohólica se monitoreó diariamente mediante medidas de turbidez y de densidad e índice de refracción (utilizando un areómetro y un refractómetro), por ser estos dos últimos parámetros proporcionales al contenido de azúcares disueltos.

Finalizadas las fermentaciones, los vinos blancos se mantuvieron a 20° C durante 12 días, luego se trasegaron a recipientes limpios para eliminar las lías gruesas, y se sometieron a maceración post-fermentativa a 5° C durante 40 días para promover la clarificación estática de los mismos. Durante este último período se realizó un trasiego adicional a todos los vinos. Finalmente los vinos se guardaron en botellas de vidrio de 500 ml de capacidad y se almacenaron a 5° C, previa adición de 50 mg / L de MBS.

Análisis del mosto

Se realizaron determinaciones de pH, acidez total, densidad y turbidez según los métodos oficiales de la OIV (O.I.V., 2013). El contenido de ácido L-málico y L-láctico se determinó siguiendo los métodos enzimáticos oficiales descritos por la OIV (O.I.V., 2013), y utilizando kits enzimáticos comerciales (L-Malic acid Cat. No. 10 139 068 035 y L-Lactic acid Cat. No. 10 139 084 035; Boehringer Mannheim / R-Biopharm). El nitrógeno fácilmente asimilable (aminoácidos libres y catión amonio, NFA) se determinó mediante valoración con hidróxido de sodio del descenso de pH producido por la formación de derivados metilénicos de amonio y aminoácidos luego de la adición al mosto de un exceso de metanal (García Barcelo, 1990).

Análisis del vino blanco

Se realizaron determinaciones de pH, acidez total, dióxido de azufre libre y total, turbidez y azúcares reductores siguiendo los métodos oficiales de la OIV (O.I.V.; 2013).

La acidez volátil real se determinó por destilación directa de un volumen de vino seguido de valoración de una fracción del destilado por el método de García-Tena (García Barcelo, 1990). El grado alcohólico se determinó por ebulloimetría, basada ésta en la Ley de Raoult relativa a la disminución del punto de ebullición, empleando un ebulómetro marca Gab y según la metodología descrita por el fabricante. El contenido de ácido L-málico y L-láctico se determinó de la misma forma que al mosto.

Resultados

La Tabla 1 muestra los valores de actividad enzimática presentes en ambos preparados, determinados frente a ácido poligalacturónico (PGA) a pH 5,0 y 35° C, y frente a pectina de manzana a pH 3,5 y 20° C, siendo esta última condición más semejante a las que ocurren durante la elaboración de vinos.

TABLA 1. Actividades enzimáticas por gramo de preparado

Preparado Pectinolítico	Actividad poligalacturonasa (U/g de preparado)	Actividad polimetilgalacturonasa (U/g de preparado)
PP-AS	9233 ± 76	219 ± 42
Lallzyme C-max	1280 ± 168	215 ± 32

Actividad poligalacturonasa determinada sobre ácido poligalacturónico a pH 5,0 y 35° C

Actividad polimetilgalacturonasa determinada sobre pectina de manzana a pH 3,5 y 20° C

Comparando los valores de actividad enzimática de ambos preparados, observa que PP-AS es al menos 7 más activo frente a PGA a pH 5,0 y 35° C que Lallzyme C-max. Por otro lado, la actividad de PP-AS frente a pectina a pH 3,5 y 20° C es similar a la de su par comercial.

La composición analítica del mosto de Viura prensado y despalillado se muestra en la Tabla 2. Un valor de densidad de 1080 g/L corresponde aproximadamente a un contenido de azúcares totales de 187 g/L y a un grado probable volumétrico de 11,1 %, ya que se admite que son necesarios 17 g/L de azúcares para producir un grado alcohólico en la vinificación en blanco. Un mosto con un nivel inicial de azúcares de alrededor de 200 g/L debe contener al menos 150 mg/L de nitrógeno para no considerarse deficiente en éste (Henschke y Jiranek, 1993), por lo que el mosto utilizado presenta un nivel de NFA suficiente.

TABLA 2. Análisis del mosto de uva blanca

Densidad (g/L) a 20° C	pH a 20° C	Acidez total (g/L de ácido tartárico)	NFA (mg/L de N)	Turbidez (NTU)
1080	3,35	6,0	196	1040

A lo largo del desfangado, los mostos suplementados con los preparados enzimáticos experimentaron un descenso de turbidez que fue, finalizado el tratamiento, significativamente mayor que el que experimentaron los mostos sin el agregado de enzimas (C) (Fig. 1.). A las 36 horas de comenzado el tratamiento los mostos tratados con 0,02 g / 3,8 L de PP-AS (AS1) tenían un promedio de 404 NTU, mientras que la turbidez media de los mostos tratados con 0,04 g / 3,8 L de PP-AS (AS2) fue de 151 NTU. Los mostos tratados con Lallzyme C-max presentaban después de 14 horas menos de 50 NTU de turbidez, valores que se mantuvieron hasta el final del tratamiento.

Cabe destacar que la cantidad de PP-AS utilizada en los ensayos de desfangado fue casi 3 y 6 veces menor que la cantidad de Lallzyme C-max (según se compare con AS1 ó AS2), puesto que las actividades específicas de dichos preparados sobre pectina a pH 3,5 y 20° C son similares entre sí (Tabla 1). Un desfangado excesivo (turbidez < 100 NTU) puede conllevar al empobrecimiento del mosto en nutrientes nitrogenados (López Martín et al., 2004), y a disminuir el aroma afrutado característico de vinos blancos secos (Ribereau-Gayon et al., 2006), por lo que la cantidad de Lallzyme C-max agregada a los mostos L sería excesiva para el tiempo que duró el tratamiento, mientras que la cantidad de PP-AS adicionada a los mostos AS2 se considera adecuada.

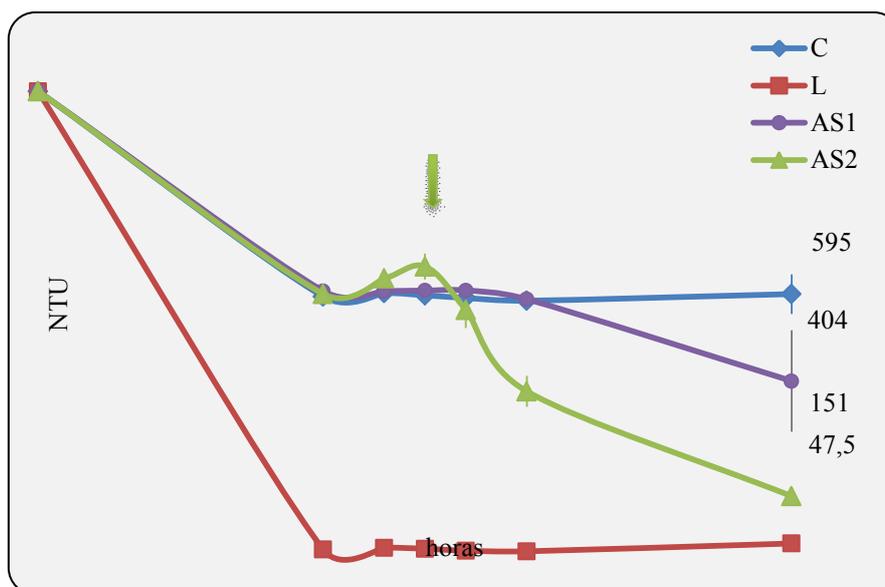


FIGURA 1. Evolución de la turbidez durante la maceración pre-fermentativa. (◇) Control sin agregado de enzimas (C); (■) Lallzyme C-max (L, 0,114 g / 3,8 L); (●) PP-AS (AS1, 0,02 g / 3,8 L); (▲) PP-AS (AS2, t ≤ 16hs 0,01 g / 3,8 L, t ≥ 16hs 0,04 g / 3,8 L). ↓ indica el momento de adición del refuerzo de PP-AS a AS2. En la figura se indican los valores finales de turbidez a las 36 horas de tratamiento.

Pasados seis días de inoculados los mostos, la densidad, directamente proporcional al contenido de azúcar, llegó a un valor constante en todos los vinos, indicativo del fin de la fermentación alcohólica. Los parámetros fisicoquímicos de los vinos producidos con los mostos desfangados enzimáticamente (L, AS1, AS2) fueron en líneas generales similares a los de los vinos producidos con el mosto control (C) (Tabla 3). Los valores de azúcares reductores residuales de todos los vinos permiten clasificarlos dentro de los vinos secos (azúcares residuales < 5 g/L; OIV, 2013). Todos los parámetros se encontraron dentro de los límites permitidos.

TABLA 3. Composición analítica final de los vinos blancos

	C	L	AS1	AS2
Azúcares reductores (g/L)	2,16 ± 0,08	2,42 ± 0,12	2,35 ± 0,03	2,31 ± 0,04
pH	3,16 ± 0,02	3,14 ± 0,01	3,14 ± 0,01	3,13 ± 0,01
Acidez Total (g/L de ácido tartárico)	6,2 ± 0,1	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,1	6,0 ± 0,1
Acidez Volátil (g/L de ácido acético)	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02
Grado alcohólico (% a 20° C)	10,7 ± 0,10	10,7 ± 0,06	10,7 ± 0,01	10,7 ± 0,01
Ácido sulfuroso libre (mg/L)	3,41 ± 1,95	6,19 ± 0,37	5,55 ± 0,74	5,55 ± 0,37
Ácido sulfuroso total (mg/L)	11,20 ± 1,60	16,53 ± 0,92	13,33 ± 0,92	14,93 ± 0,92
Turbidez (NTU)	6,30 ± 0,39	7,16 ± 0,30	6,25 ± 0,27	8,15 ± 0,29

C, control sin agregado de enzimas; L, Lallzyme C-max (0,114 g / 3,8 L); AS1, PP-AS (0,02 g / 3,8 L); AS2, PP-AS ($t \leq 16$ hs 0,01 g / 3,8 L, $t \geq 16$ hs 0,04 g / 3,8 L).

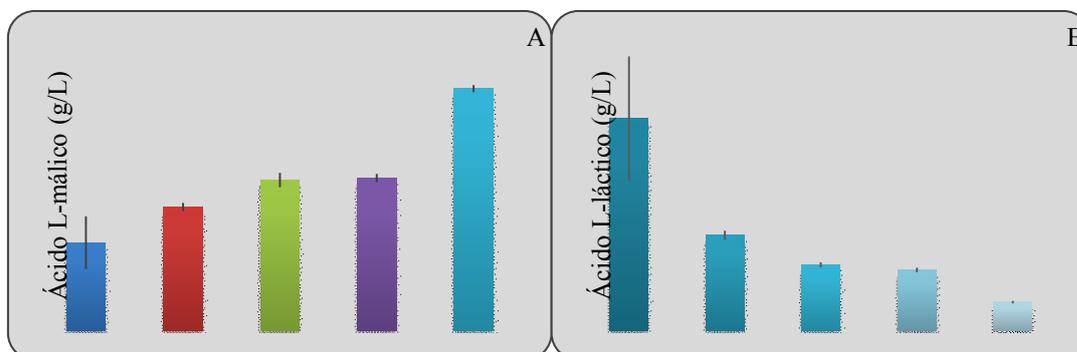


FIGURA 2. Contenido de ácido L-málico (A) y de ácido L-láctico (B) del mosto desfangado y de los vinos blancos. C, control sin agregado de enzimas; L, Lallzyme C-max (0,114 g / 3,8 L); AS1, PP-AS (0,02 g/3,8 L); AS2, PP-AS ($t \leq 16$ hs 0,01 g / 3,8 L, $t \geq 16$ hs 0,04 g / 3,8 L); Mosto, mosto de uva blanca desfangado.

El contenido de ácido L-málico y de L-láctico difiere significativamente entre los distintos vinos (Fig. 2). Se observa que el contenido de ácido L-málico de los vinos AS1 y AS2 es un 19 % mayor que el de los vinos L, y un 42 % mayor que el de los vinos C. A su vez, los vinos AS1 y AS2 son los que presentan niveles residuales de ácido L-láctico, mientras que los vinos C son los que poseen niveles que indican el inicio de una fermentación maloláctica. Los vinos blancos, como los vinos blancos secos elaborados en la zona de La Rioja, España, se caracterizan por su sabor fresco y por ello se intenta conservar el ácido málico y evitar la fermentación maloláctica con el fin de mantener la acidez y características varietales frescas y afrutadas (Boulton et al., 1999). Esta aparente represión de la flora bacteriana en los vinos cuyos mostos han sido tratados con enzimas, y especialmente en los tratados con PP-AS, puede deberse a una menor carga bacteriana en los vinos debido a un desfangado más eficaz, ó bien a algún tipo de compuesto con actividad antimicrobiana que pueda estar presente en PP-AS. En cualquier caso, se observa que los niveles de ácido L-málico se han preservado considerablemente en los vinos producidos a partir de los mostos tratados con PP-AS, lo cual es un aspecto positivo y buscado en la elaboración este tipo de vinos blancos jóvenes.

Conclusiones

Los valores de actividad pectinolítica específica del preparado de *A. sojae* (PP-AS), determinada en condiciones similares a las utilizadas en la elaboración de vinos blancos y tintos (pH 3,5 y 20° C), fueron similares a los de un preparado comercial normalmente utilizado en la clarificación de mosto y vino. Estos resultados dan cuenta del potencial de PP-AS para ser utilizado en procesos de clarificación.

Los mostos tratados con el preparado PP-AS, experimentaron durante el desfangado un marcado descenso de turbidez respecto a los mostos sin tratar, y con una turbidez media de 151 NTU, el cual es un valor considerado como óptimo la utilización del mosto en la elaboración de vinos blancos de calidad.

La fermentación alcohólica transcurrió sin inconvenientes, y se obtuvieron vinos blancos secos, con parámetros químicos normales y adecuados. El contenido de ácido L-málico de los vinos blancos elaborados de a partir del mosto desfangado con PP-AS

fue significativamente mayor que el contenido de ácido L-málico de los demás vinos blancos elaborados, lo cual es positivo para la elaboración de vinos blancos secos con características de frescor y que conserven sus aromas varietales afrutados.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido llevado a cabo con la ayuda del proyecto FP7-PEOPLE-2012-IRSES-269211-PGSYS de la EU.

Bibliografía

- Boulton, R. B.; Singleton, V. L.; Bisson, L. F.; (1999). Principles and Practices of Winkemaking. Ed. Chapman & Hall.
- Flanzy, C. (2000). Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Ed. A. Madrid Vicente y Mundi-Prensa.
- García-Barcelo, J. (1990). Técnicas analíticas para vinos. Ed. GAB.
- Henschke, P.A. y Jiranek, V. (1993). Yeast metabolism of nitrogen compounds. Wine Microbiology and Biotechnology. Ed. Fleet G.H., 77-165.
- López Martín, R.; Santamaría Aquilué, P.; Epifanio, S.; Garijo, P., Gutiérrez, A.R. (2004). La adición de materia nitrogenada al mosto de uva. Zubía Monográfico, 16-17: 83-92 (ISSN 1131-5423).
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.
- O.I.V. (2013). Compendium of international methods of wine and must analysis. Paris: International Organisation of Vine and Wine.
- Ribereau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B.; Lonvaud, A. (2006). Handbook of enology vol. 1 the microbiology of wine and vinification 2nd ed. Ed. John Wiley y Sons.