



Interes de la purificacion de las enzimas

Séminaire Lamothe-Abiet, 6 de Junio 2013, Logroño

Rose-Marie Canal-Llaubères

Pureza aromática de los vinos

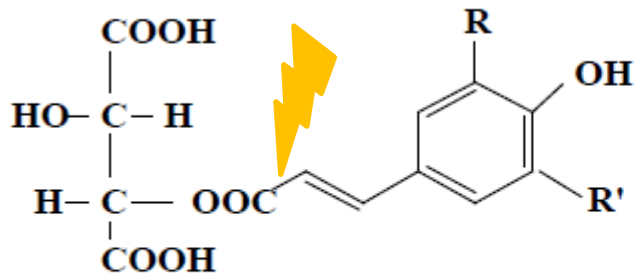
- Origen de la formación de los fenoles volátiles
- Las vías enzimáticas de producción
- Porque las levaduras producen fenoles volátiles?
- Las enzimas FCE: cual control de calidad?
- Ventajas de las pectinasas extra purificadas

Origen de las fenoles volátiles

- La pureza aromática es siempre mas importante para los consumidores
- Los fenoles volátiles (FV) son responsables de off-aromas en vinos blancos, rosados y tintos
- Los FV pueden ocultar los aromas afrutados
- La origen de estos compuestos viene de la uva

Cuales son los precursores?

Los ácidos fenoles libres de la uva



$R = R' = H$: acide trans-p-coumaroyltartrique

$R = OH, R' = H$: acide trans-caféoyltartrique

$R = OH, R' = OCH_3$: acide trans-féruoyltartrique

	<i>Uva y clima</i>	
<i>Precursores de los FV</i>	madurez importante	zona calida
ácido p-coumarico	+++	+++
ácido ferulico	++	++

Localización de los precursores

Película y pulpa de la baya

- Acumulando durante la primera fase de crecimiento de la baya

Papel de estos compuestos

- Reacciones de oxidación
- Precursores de los FV

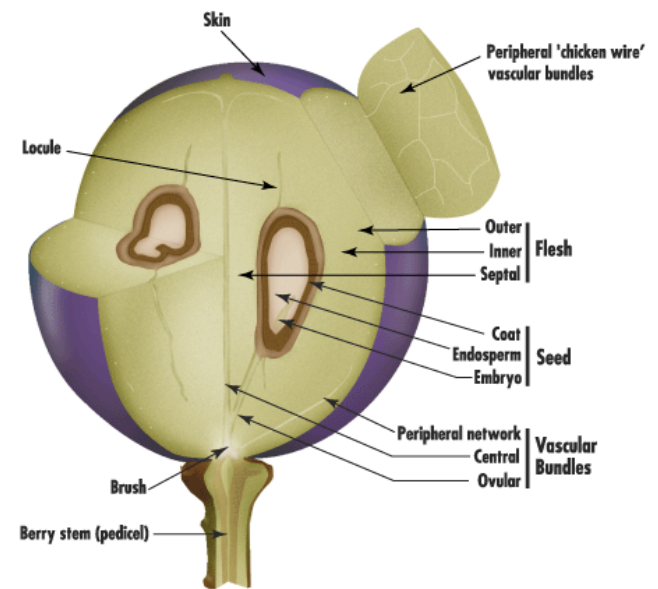


Figure 1: Structure of a ripe grape berry partially sectioned on the long and central axis to show internal parts. Illustration by Jordan Koutroumanidis, Winetitles.

Tipo de olores en los vinos

Vinos blancos y rosados: **vinyl fenoles**

- Pérdida de frescura y de los aromas afrutados
- Olores pesadas : farmacia, solvente
- Umbral: ca. 700 $\mu\text{g/l}$



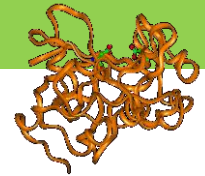
Vinos tintos: **etilo fenoles**

- Olores de corral, sudor, humo
- Umbral: ca. 400 $\mu\text{g/l}$



Riesgo de desviación aromática de los vinos: **proceso enzimático**

Las vías enzimáticas de producción



Must extraction & clarification

Grape must precursors
acid phenol tartrate esters

Cinnamoyl Esterase
CE

Source of CE
pectinases A.niger, Botrytis

Source of CD
yeast S. cerevisiae, Brettanomyces

Source of VPR
yeast Brettanomyces

Free acid phenols

Fermentation

**Cinnamate
Decarboxylase**
CD

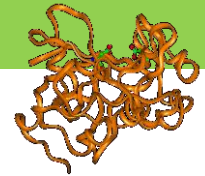
Volatile vinyl phenols

Ageing

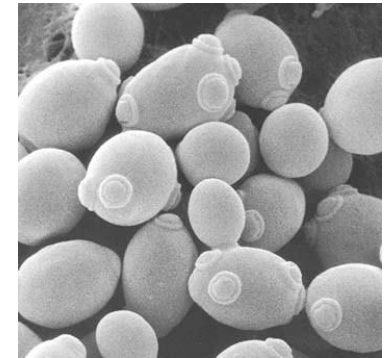
**Vinyl Phenol
Reductase**
VPR

Volatile ethyl phenols

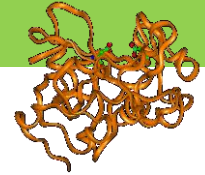
Porque las levaduras producen FV?



- La mayoría de las cepas de levaduras indígenas o seleccionadas producen una **Cinamata Decarboxilasa**, **CD**: cepas pof^+
- Las cepas de levaduras pof^- no producen CD. Pocas cepas son disponible en vinificación.
- La **CD** es responsable de la formación de los vinyl fenoles en blancos y rosados
- La **Vinyl Fenol Reductasa**, **VFR** es responsable de la formación de los etilo fenoles in tintos
 - Desarrollo de *Brettanomyces*

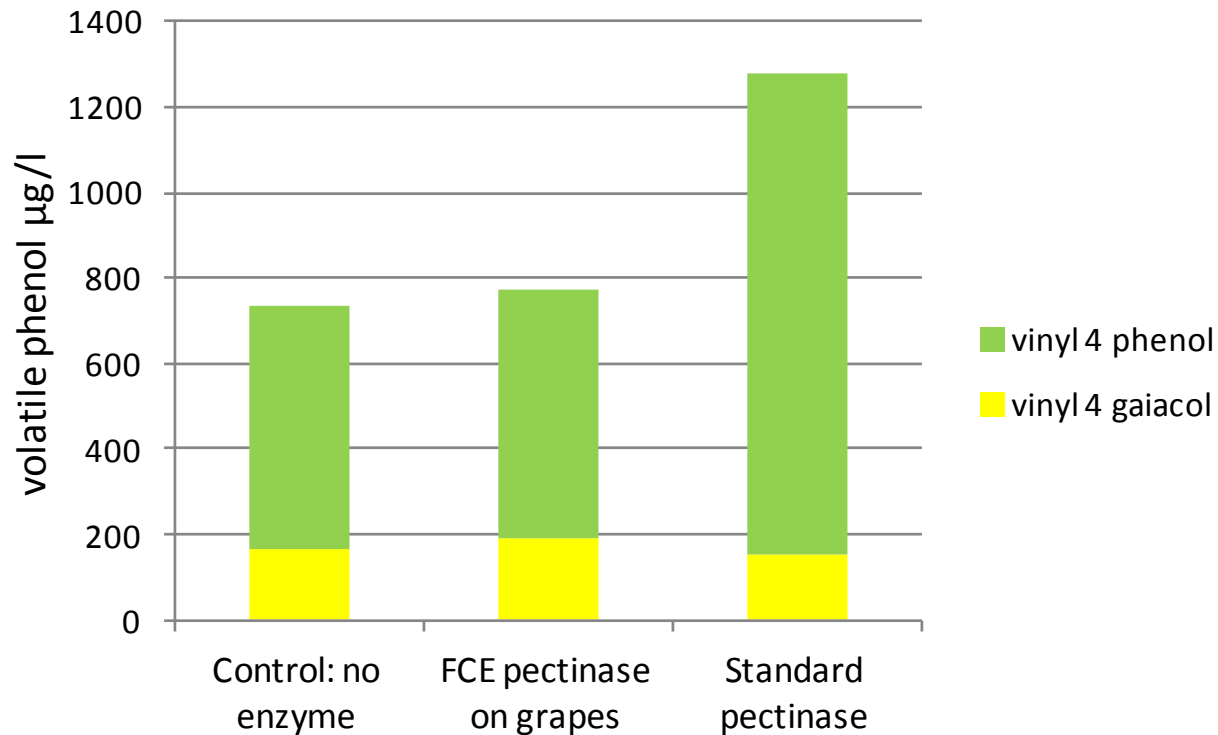


Maceración con enzimas



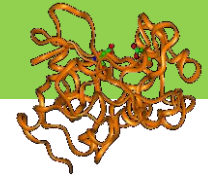
Efecto sobre la formación de los FV

En Sauvignon blanc

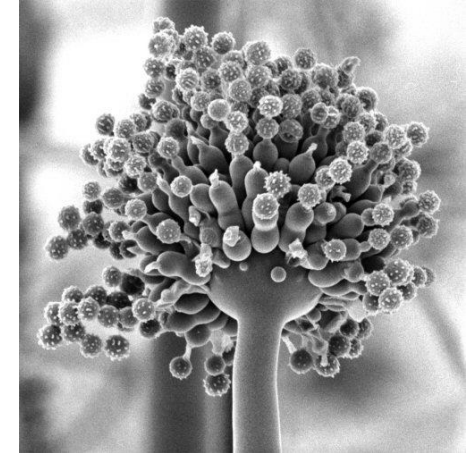


Source: Chatonnet et al. 1992

Las pectinasas de *A.niger*



- Todas las cepas de *Aspergillus niger* o *asimiladas* (*A. aculeatus*) producen una actividad **Cinnamoyl Esterasa, CE**
- Todas las pectinasas comerciales contienen un cierto nivel de **CE**, que sean producidas por método sumergido o de superficie
- La **CE** a sido purificada y identificada por C. Barbe
 - PM: 240,000 Da, 2 sub-unidades
- La **CE** interviene en la **primera etapa enzimática** de la formación de los fenoles volátiles



El concepto “FCE”

Un concepto iniciado por Novozymes

Free Cinnamoyl Esterase - Tesis C. Barbe, Universidad de Burdeos




- Etapa de purificación suplementaria para eliminar la actividad CE de las pectinasas y la glucosidasa (“antocianasa”)
- Tratamiento del concentrado con pH bajo durante muchas horas
- Estandarización del preparado de pectinasas con control de actividad CE

Pectinasas FCE* = pectinasas purísimas de calidad enológica

Vinozym FCE, Vinozym Vintage FCE, Novoclair Speed FCE, **Vinozym Ultra FCE (new)*

Las pectinasas “FCE”: cual control?

- Medida de la actividad CE durante el proceso de producción: liquido concentrado, estandarización, producto final
- Desarrollo de un nivel de purificación garantizando la neutralidad de la pectinasa vis a vis de la formación de los FV
 - Limite  : < 0.5 CINU/1000 PGNU
- Indicación en la etiqueta del producto de la etapa de purificación de la enzima (norma FIAP).

Seguridad de pureza para la bodega

Un método OIV para medir la CE

Un método desarrollado en 2007

CODEX ŒNOLOGIQUE INTERNATIONAL

Cinnamoyl estérase

COEI-1-CINEST : 2007

**MESURE DE L'ACTIVITE CINNAMOYL ESTERASE
(Oeno 6/2007)**

Interés de la purificación en tintos

A parte de no formar mas fenoles volátiles

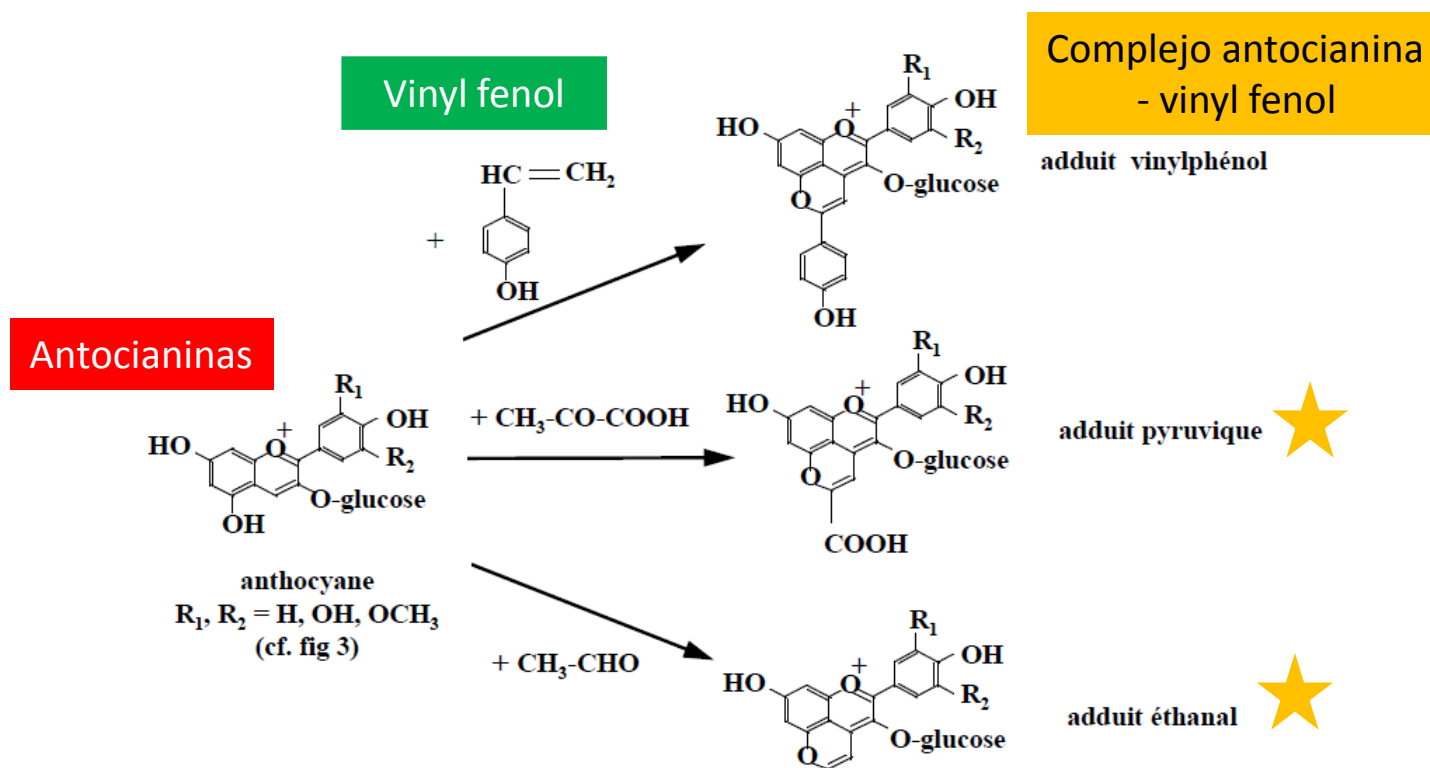
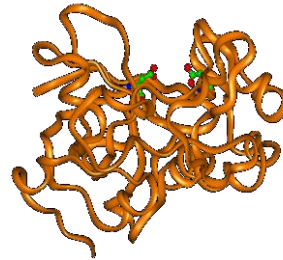


Figure N°10 : Nouvelles réactions des anthocyanes conduisant à des pigments orangés stables.

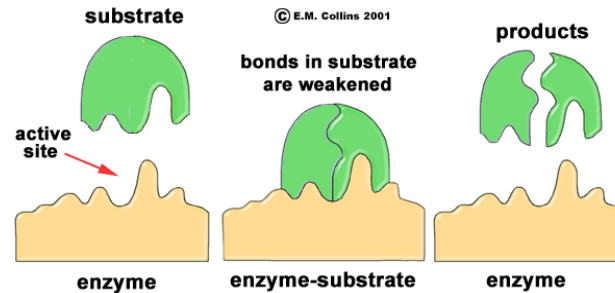
Evitar de formar pigmentos estables naranjos

Las enzimas: definiciones

- Catalizador
- Herramienta de la naturaleza
- Especificas: « llave- cerradura»
- Condiciones suaves



velocidad
bio degradable
respecto del vino



Objetivos del uso de pectinasas

Vinificación en blancos y rosados

- Rendimiento: total, gota y fracción <1 bar
- Optimización del prensado, reducción de tiempo, limpieza
- Clarificación: reducción del tiempo y aumento de rendimiento (centrifuga, RSV), compactación de lías.
- Amejoramiento aromático

Vinificación en tintos

- Rendimiento: total, vino de gota, prensa
- Clarificación
- Filtrabilidad
- Amejoramiento sensorial

Ventajas del uso de pectinasas “FCE”

Extracción y maceración



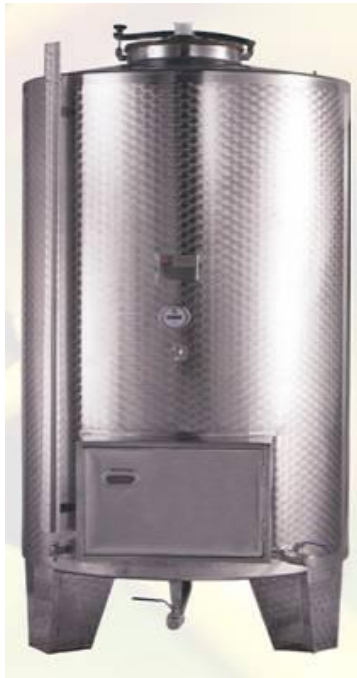
Proceso mas suave con enzima



- Limitar la extracción de los esteres tartáricos de los ácidos fenoles
- Evitar la hidrolisis de estos esteres
- Evitar el aumento de los ácidos fenoles libres responsables de la formación de los FV
- Controlando el proceso y su economía: aumento de rendimiento y calidad

Ventajas del uso de pectinasas “FCE”

Clarificación - desfangado



- Evitar la hidrólisis de los esteres de fenoles volatiles
- Evitar el aumento de los ácidos fenoles libres responsables de la formación de los FV
- Controlando el proceso y su economía: aumento de rendimiento y calidad

Para concluir ...

Felices enólogos y productores de vinos



Vinos
afrutados



Complejidad
con fruta

con herramientas de la biotecnología de calidad certificada, controlando el proceso

Gracias por su atención!

Preguntas?