

# EXTRACTO PECTINOLÍTICO PRODUCIDO POR *BACILLUS* sp. SC Ch 15 Y SU APLICACIÓN EN LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS Y POLIFENOLES TOTALES DE UVA.

Martín, M.C.<sup>1,2</sup>, Morata de Ambrosini, V.I.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo - Bernardo de Irigoyen 375, 5600 San Rafael, Mendoza, Argentina.*

<sup>2</sup> *CONICET.*

[mcmartin@fcai.uncu.edu.ar](mailto:mcmartin@fcai.uncu.edu.ar)

## 1. Resumen

El uso de enzimas pectinolíticas en el proceso de vinificación tiene el propósito de aumentar el contenido fenólico (incluidos los pigmentos), mejorar el rendimiento, y facilitar las etapas de clarificación y filtración. Las maceraciones con pectinasas mejoran notablemente los tenores de polifenoles. Estas están condicionada por diversos factores físico-químicos, siendo uno de los más importantes el pH. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la adición de un nuevo preparado pectinolítico obtenido de *Bacillus* sp. SC Ch-15, sobre la extracción de pigmentos y polifenoles totales, en la maceración de mostos de uva Malbec, y realizar un análisis comparativo con preparaciones comerciales (Inozyme terroir y Extrazyme terroir - Institut Enologique de Champagne). Se estudió, asimismo, los cambios producidos por modificación del pH, tanto sobre la actividad pectinásica como sobre el equilibrio de antocianos. Se observó que el uso del nuevo preparado pectinolítico SC Ch-15 produjo mostos más ricos en compuestos fenólicos y con un mejor aspecto visual, a pH 5 (óptimo de la enzima) y a 30°C. Se encontró un óptimo de concentración enzimática para la extracción de color de 5,88% (ml extracto enzimático crudo/100 ml solución). Al pH de mostos (3,5), tanto el preparado enzimático en estudio como los comerciales, disminuyeron significativamente la actividad pectinásica. Asimismo, se observó el efecto neto del pH sobre la composición antociánica, indicando que este factor resulta ser un parámetro crítico en el proceso de vinificación. Las coordenadas CIE-Lab permitieron una definición mucho más precisa que los parámetros clásicos, observándose cambios relevantes en el color al pH de mostos y vinos por el uso del preparado SC Ch-15.

## 2. Marco teórico

El color es uno de los parámetros organolépticos más importantes de un vino tinto y su calidad y estabilidad dependen del contenido en compuestos fenólicos y de las combinaciones que se establezcan entre ellos. Algunos de ellos, como los flavonoides y estilbenos, han sido estudiados por ser responsables de varios efectos fisiológicos beneficiosos asociados con el consumo de vino tinto, en general debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Monagas y col., 2006; Stoclet y col., 1999). Los antocianos se encuentran, particularmente, en las vacuolas presentes en las pieles de los granos de uva y en la pulpa, en el caso de las variedades tintas. Al comienzo del proceso de vinificación, los antocianos son extraídos de los hollejos por la ruptura de las células y las vacuolas, pasando rápidamente al mosto, el cual presenta un bajo contenido alcohólico. La adición de enzimas pectinolíticas es una práctica común en la elaboración de vinos, para aumentar el contenido fenólico, mejorar el rendimiento, y facilitar las etapas de

clarificación y filtración (Kashyap y col., 2001). Las pectinasas son complejos enzimáticos efectivos en la despolimerización de pectinas vegetales, polisacárido estructural de la pared celular vegetal, y actúan facilitando la liberación de moléculas asociadas a la membrana celular o intracelular a partir de bayas de uvas, tales como polifenoles, pigmentos y compuestos de aroma y sabor (Valdés Sánchez y Regodón, 1994).

Las pectinasas extracelulares pueden ser producidas por diferentes microorganismos, las más comunes en el mercado son producidas por hongos. Dentro de las bacterias, el género *Bacillus* es un candidato ideal para producir enzimas. Además, la mayoría de las especies son consideradas GRAS (Generally Regarded As Safe) por la FDA (Gordon, 1977). En nuestro laboratorio se aisló la cepa *Bacillus* sp. SC Ch-15 por su buena actividad pectinolítica a baja temperatura, 15°C (Cabeza y col., 2005).

Por otro lado, la extracción de los polifenoles de la uva durante la maceración es condicionada por diversos factores. De las condiciones físico-químicas que afectan la estabilidad de antocianinas en mostos y vinos, la influencia del pH es bien conocida. En soluciones acuosas, los antocianos existen como una mezcla de diferentes estructuras en equilibrio químico con coloraciones características, lo que condiciona en forma muy importante el color del vino (Heredia y col., 1998).

La definición y evaluación objetiva del color del vino es un tópico complicado. El método de referencia es el propuesto por la O.I.V. (1990), aunque se ha demostrado que carece de precisión en el caso de vinos fuertemente coloreados (Heredia y Guzmán, 1991). La aplicación de sistemas colorimétricos, como el método estandarizado de la “Comisión Internacional de L’Eclairage” (CIE-Lab, 1986), es de gran valor en la cuantificación y caracterización de propiedades cromáticas de antocianos. La aplicación de valores triestímulos ofrece una medición más objetiva del color, debido al hecho de que está basado sobre la consideración de todo el rango del espectro visible, y permite que el perfil real cromático de cada compuesto sea obtenido (Heredia y col., 1998). Los parámetros triestímulos han sido ampliamente aplicados a alimentos con diferentes propósitos y han sido relacionados a concentración de pigmentos (Ihl y col., 1994) y parámetros físico-químicos y sensoriales (Heredia y Guzmán, 1995).

### **3. Objetivos**

El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la adición de un nuevo preparado pectinolítico obtenido de *Bacillus* sp. SC Ch-15, sobre la extracción de pigmentos y polifenoles totales, en la maceración de mostos de uva Malbec, y realizar un análisis comparativo con preparaciones comerciales comúnmente utilizadas en vinificación. Asimismo se pretende estudiar los cambios producidos por modificación del pH, tanto sobre la actividad pectinásica como sobre el equilibrio de antocianos, parámetro fundamental en el color de los vinos tintos.

### **4. Materiales y Métodos**

#### **4.1. Obtención del preparado enzimático**

La cepa *Bacillus* sp. SC Ch-15 fue aislada en trabajos previos a partir de uvas de la región DOC de San Rafael (Mza.) (Cabeza y col., 2005). El medio de cultivo utilizado fue el caldo Pectato modificado (Kobayashi y col., 2000). La obtención del extracto enzimático crudo se realizó mediante centrifugación a 5000xg durante 15 min. y filtración esterilizante (0,22 µm) del cultivo bacteriano crecido 24 h a 30°C y 65 rpm.

#### **4.2. Enzimas comerciales**

Se utilizaron soluciones de *Inozyme Terroir* y *Extrazyme Terroir* (Institut Œnologique de Champagne).

#### **4.3. Ensayo de la actividad pectinásica**

La actividad pectinásica fue determinada por la cuantificación de azúcares reductores liberados a partir de una dispersión de pectina al 0,25% en buffer acetato de Na con el reactivo ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Unidad enzimática (UE) es la cantidad de enzima que libera un  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico/min.

#### **4.4. Ensayo de actividades secundarias (xilanasas, celulasa y $\beta$ -Glucosidasa)**

Las actividades xilanasas y celulasa fueron determinadas de acuerdo a los métodos descritos por Chadha y col. (2005) y Sharma y col. (2007), respectivamente, con algunas modificaciones. Fueron utilizados como sustratos xilano birchwood y celulosa microgranular, preparados al 1% en buffer acetato de Na (pH 4). La cantidad de azúcares reductores liberados fue cuantificada usando xilosa o glucosa como estándar. La actividad  $\beta$ -glucosidasa fue cuantificada por medición de glucosa liberada a partir de celobiosa utilizando un kit enzimático específico (Ghose, 1987).

#### **4.5. Determinación del pH óptimo**

El efecto del pH sobre la actividad enzimática fue estudiado sobre sustratos constituidos por pectina a una concentración de 0,25% en distintos buffer, abarcando un rango de pH de 3 a 10. Seguidamente, se incubó la mezcla de reacción 30 min. a 20°C y se midió la actividad pectinolítica (Miller, 1959).

#### **4.6. Efecto de las preparaciones pectinolíticas sobre la extracción de pigmentos y polifenoles a partir de hollejos de uva**

Los ensayos se realizaron a partir de 1,65g de hollejos de uvas de la variedad Malbec y se adicionó a cada tubo una cantidad creciente de extracto enzimático crudo SC Ch-15 (50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{L}$ ) y un volumen de buffer acetato de sodio (pH 3,5 o pH 5) tal que el volumen final sea igual a 2,5 ml. Por otro lado, se analizaron las preparaciones comerciales (*Inozyme* y *Extrazyme*), utilizando 2,4 ml de buffer acetato de sodio y 100  $\mu\text{L}$  de una solución de dichas enzimas (concentraciones de 1,5 y 3 g/hL, respectivamente). Se maceró 2 horas con agitación a 130 rpm y a 30°C. Las absorbancias se determinaron a longitudes de onda ( $\lambda$ , nm): 420, 450, 520, 570, 620, 630 y 750.

Se utilizaron los parámetros clásicos de análisis de color. El Índice de Color (IC), según Glories (1984), se obtiene a partir de las sumas de las absorbancias a tres  $\lambda$  (420, 520 y 620 nm), y el Índice de Sudraud (1958) define el Matiz como la relación entre la absorbancia a 420 y 520. El análisis del Contenido de Polifenoles Totales (TPC) fue realizado mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, con ácido gálico como estándar (Singleton y Rossi, 1965). Se calcularon los valores triestímulos según la "Comisión Internacional de L'Eclairage" (CIE, 1986). Mediante un software apropiado se calcularon los parámetros CIE-Lab: Luminosidad ( $L^*$ ), verde-rojo ( $a^*$ ), azul-amarillo ( $b^*$ ), Saturación o chroma métrico ( $C^*$ ) y Tonalidad ( $H^*$ ). Se calculó también la diferencia de color CIE-Lab ( $\Delta E_{Er,s}$ ), entre cada

muestra y la EN, definida como  $[(L^*)^2 + (.a^*)^2 + (.b^*)^2]^{1/2}$ . Valores mayores a 2,7 indican dos colores distinguibles por el ojo humano (Negueruela y col., 2001).

#### 4.7. Análisis Estadístico

Todos los resultados se analizaron mediante ANOVA y Test de Rangos Múltiples, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1. Las diferencias entre medias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor p del test F fue menor a 0,05 (95% de nivel de confianza).

### 5. Resultados y Conclusiones

#### 5.1. Actividad pectinolítica de las preparaciones enzimáticas

La cepa *Bacillus* sp. SC Ch-15 fue seleccionada, en trabajos previos, por ser una cepa con buena actividad pectinolítica a baja temperatura (15°C). La enzima comercial *Inozyme terroir* es una preparación utilizada para la clarificación, mientras que *Extrazyme terroir* es usada para la extracción de compuestos aromáticos y de color. En la Tabla 1 se comparan las actividades pectolíticas específicas (UE/gramo de proteínas), a pH 5, óptimo de los preparados en estudio y a pH 3,5, pH de mostos y vinos.

**TABLA 1:** Actividad pectinásica específica del extracto enzimático crudo SC Ch-15 y de las enzimas comerciales, a 30°C y pH 5 / 3,5.

Enzima	Actividad específica pH 5 (UE/g)	Actividad específica pH 3,5 (UE/g)
Ch-15	6957	173
Extrazyme terroir	30729	2057
Inozyme terroir	12085	57

El extracto enzimático SC Ch-15 presentó muy buena actividad pectinolítica a pH 5, considerando que se trata de un extracto crudo (sin purificar). Respecto a la acción enzimática a pH 3,5, las tres preparaciones enzimáticas dieron valores mucho más bajos, presentando una actividad del 2, 6 y 0,5% de la correspondiente a pH 5, respectivamente. Cabe destacar que la actividad del preparado enzimático en estudio resultó mayor que la del preparado comercial *Inozyme terroir*. Estos resultados demostraron claramente que el pH de los mostos resulta ser una condición crítica para la actividad de las enzimas pectolíticas.

#### 5.2. Actividades secundarias

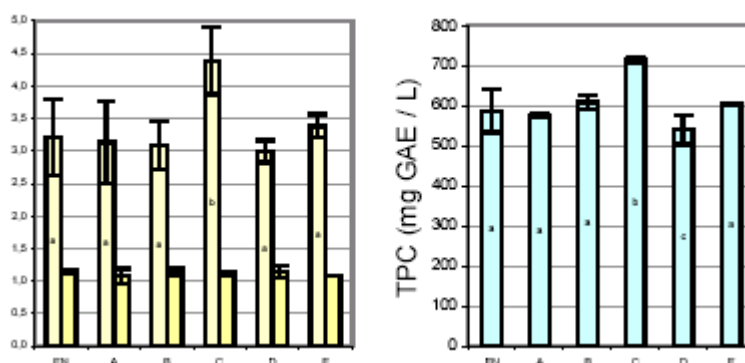
Celulasa, xilanas y  $\beta$ -glucosidasa fueron determinadas sobre el extracto enzimático SC Ch-15. La actividad celulasa fue de 0,014 UE/ml (30°C) y 0,032 (15°C) y la xilanas de 0,056 (30°C) y 0,038 UE/ml a (15°). Celulosa y xilano, son los constituyentes principales junto con la pectina de la paredes celulares vegetales. No fue detectada actividad  $\beta$ -glucosidasa, lo que resulta ventajoso para la aplicación del preparado pectinolítico SC Ch15 ya que esta enzima actúa hidrolizando parcialmente a los antocianos reduciendo el color de los vinos (Todaro y col., 2008).

#### 5.3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto Ch-15

Alcanzó un máximo de actividad a pH 6, sin embargo a pH 3,5-4 (valor próximo al pH de los mostos) mantuvo casi el 60% de la actividad (datos no mostrados).

### 5.3. Efecto de las preparaciones pectinolíticas sobre la extracción de color

Se practicó a partir de hollejos de uvas tintas, con el preparado enzimático SC Ch-15, a 30°C y pH 5. Produjo comportamientos similares tanto para el CI como para el TPC. Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), respecto a la EN, se observaron a 150  $\mu$ L del extracto enzimático (muestra C = 0,0209 UE). A dicha concentración se logró un aumento para el TPC de 126,7 mgGAE/L y un aumento de casi una unidad y media para el CI. Para concentraciones menores o mayores a la muestra C, no se observaron diferencias significativas, indicando que se trató de un valor óptimo. Con respecto al Matiz (relación pigmentos amarillos sobre rojos) no se observaron diferencias significativas (Figura 1).



**FIGURA 1:** Efecto del preparado enzimático SC Ch-15 sobre el Índice de Color, el Matiz y el TPC. Las distintas mezclas fueron conformadas por los hollejos y una cantidad creciente de extracto enzimático siendo las UE netas en cada mezcla de reacción: A = 0,00695; B = 0,0139; C = 0,0209; D = 0,0278; E = 0,0348. EN = extracción natural. Las distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0,05$ ).

Hubo diferencias entre el preparado en estudio (muestra C) y las enzimas comerciales, dependiendo del pH del medio de reacción (Tabla 2).

**TABLA 2:** Efecto de las preparaciones pectinolíticas sobre la extracción de color: Índice de Color (IC), Matiz (M) y Contenido de Polifenoles Totales (TPC).

	pH 5			pH 3,5		
	IC	M	TPC	IC	M	TPC
Extracción natural	3,2 <sup>a</sup>	1,14 <sup>a</sup>	586,7 <sup>a</sup>	5,6 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	613,2 <sup>a</sup>
SC Ch-15	4,4 <sup>b,c</sup>	1,11 <sup>a</sup>	713,4 <sup>b</sup>	5,7 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	646,8 <sup>a</sup>
Inozyme terroir	4,6 <sup>c</sup>	1,16 <sup>a</sup>	678,0 <sup>b</sup>	5,3 <sup>a</sup>	0,53 <sup>a</sup>	667,9 <sup>a</sup>
Extrazyme terroir	3,3 <sup>a,b</sup>	1,11 <sup>a</sup>	731,5 <sup>b</sup>	5,7 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	763,9 <sup>b</sup>

Los valores seguidos de letras diferentes indica que son significativamente distintos entre ellos, con  $p < 0,05$  de acuerdo al Test de Rangos Múltiples.

A pH 5, el extracto SC Ch-15 mostró propiedades similares a los preparados comerciales, tanto para CI como para TPC. Los dos fueron significativamente mayores que los producidos por la EN. En el matiz, no se observaron cambios significativos. Por otro lado, la extracción a pH 3,5 produjo valores bastante mayores en el CI y TPC comparados con la extracción a pH 5, para todas las muestras. El efecto neto del pH fue evidente sobre la

composición antocianica de los macerados, ya que la EN exhibió también altos valores. Por lo que no se observaron diferencias significativas, excepto para Extrazyme en el TPC. En cuanto al matiz, fue menor que el correspondiente a pH 5, indicando mayor concentración de antocianos en la forma iónica de catión flavilio, de intensa coloración rojiza. Por lo tanto, puede concluirse que el pH de mostos y vinos es también un parámetro crítico para la extracción, y que el agregado de estas preparaciones pectolíticas mostró poco o ningún efecto sobre el color en el análisis de los parámetros clásicos.

Por otra parte, fue estudiado el efecto sobre la extracción de color por valores triestímulos. Las coordenadas CIE-Lab, comparadas con los parámetros clásicos, resultaron ser los métodos más fieles y útiles de medición de color para caracterizar y diferenciar vinos (Pérez-Magariño y González-Sanjosed, 2001). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

**TABLA 3:** Efecto del extracto pectinolítico SC Ch-15 y preparados comerciales sobre los parámetros CIE-Lab. EN = extracción natural; C (SC Ch -15)=0,0209 UE; Inozyme=0,0319 UE; Extrazyme=0,0598 UE.

	L*	C*	H*	a*	b*	?Er,s
pH 5						
EN	82,8	9,73	23,02	8,96	3,81	
C	77,0	13,67	23,00	12,59	5,34	7,0
Inozyme	76,3	15,64	10,00	15,40	2,72	9,2
Extrazyme	82,1	11,00	19,24	10,39	3,63	1,6
pH 3,5						
EN	70,7	34,93	359,60	34,93	-0,26	
C	69,0	37,95	0,43	37,95	0,28	3,5
Inozyme	70,8	37,43	354,90	37,29	-3,31	3,9
Extrazyme	69,5	37,31	359,40	37,30	-0,40	2,7

Con respecto a la muestra C (valor óptimo para SC Ch-15) a pH 5, pudo observarse una menor luminosidad respecto a la EN (debido a alto valor del CI, ya que ambos poseen una relación inversa) (Negueruela y col., 2001). La saturación o chroma métrico (C\*: contribución de a\* y b\* en el color total) aumentó, por aumento de a\* (rojo) y b\* (amarillo). En cuanto al tono (H\*; expresado en grados, 0-360°), que refleja especialmente a los pigmentos amarillos, no se observó diferencia con respecto al blanco. Estos resultados indican una buena contribución de los tonos rojos, característica muy valorada en vinos tintos. Un observador detectaría características cromáticas diferenciales en una copa cuando el valor de la diferencia CIE-Lab (?Er,s) sea mayor o igual a 2,7 unidades (Negueruela y col., 2001). En base a esto puede confirmarse que un observador notaría disparidades para la muestra C (SC Ch-15) y para Inozyme terroir. Además, Inozyme terroir presentó propiedades semejantes a Ch-15 a pH 5, mientras que Extrazyme terroir no mostró ninguna característica especial.

En cuanto a las coordenadas CIE-Lab medidas a pH 3,5, se observaron diferencias con respecto a EN, en el valor C\*, particularmente en el parámetro a\* para todas las muestras. Esto indica que ciertamente hubo mayor concentración de pigmentos rojos en las muestras tratadas con enzimas. Con respecto a la diferencia de color CIE-lab (?Er,s), se lograron también valores mayores de 2,7 para la muestra SC Ch-15 e Inozyme terroir. Por lo tanto, se puede concluir, de acuerdo a estos parámetros, que la presencia de enzimas pectolíticas

produjo cambios relevantes en el color al pH de mostos y vinos, con características favorables, lo cual no pudo detectarse con la medición de los parámetros clásicos.

## 6. Bibliografía

- Cabeza, M.S.; Baca de Giménez, F.S. ; Muñoz Puentes, E. ; Morata de Ambrosini, V.I. (2005) Microorganismos productores de pectinasas activas a bajas temperaturas para vinificación. CIBIA V, Libro de Art. en Extenso, Tomo III, Art. 6, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Chadha, B.S.; Sonia, K.G.; Saini H.S. (2005) Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D2W3) under solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 96: 1561–1569.
- Gloris, Y. (1984) La Couleur des vins rouges. Première partie: Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Conn. Vigne Vin.* 18: 195-217.
- Gordon RE. En: Laskin A, Lechevalier HA, editors. Vol. 1: The genus *Bacillus*. *Handbook of Microbiology*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1977, p. 319-336.
- Heredia F. and Guzmán-Chozas M. (1991) Reliability of the Spanish official method for colour of red wines in comparison with CIE 1931 (x,y) method. *Food Chemistry*, 39, 167-174.
- Heredia, F. J. and Guzmán, M. (1995) Relationships between physico-chemical characteristics and some relevant chromatic parameters in Spanish red wines. *Sciences des Aliments*, 15, 551-558.
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E., Rivas-Gonzalo, J.C., Vicario, I.M., and Santos-Buelga, C. (1998) Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes. I) pH effect. *Food Chemistry*, 63 (4), 491-498.
- Ihl, M., Shene, C., Scheuermann, E. and Bifani, V. (1994) Correlation for pigment content through colour determination using tristimulus values in a green leafy vegetable, Swiss chard. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 527-531.
- Kashyap D.R., Vohra S., Chopra R. and Tewari R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227.
- Kobayashi T., Higaki N., Yajima N., Suzumatsu A., Hagihara H., Kawai S. and Ito S. (2000) Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (4), 842-847.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. (2006) Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chem.*, 95: 405-412.
- Negueruela, A., Echávarri, J., Ayala, F. (2001) Caractéristiques chromatiques. OIV. Feuille Verte; 1102.
- O.I.V. (1990) *Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des vins et des moûts*. Paris, France: Office International de la Vigne et du Vin.
- Pérez-Magariño S., González-Sanjosé M. L. (2001) Differentiation parameters of “Ribera del Duero” D.O. wines from other Spanish D.O. *Food Sc. and Technol. Internat.*, 7: 237-244.
- Sharma Jitender, Ramesh Chander Kuhad, Bindu Battan, Saurabh Sudha Dhiman. (2007) Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme and Microbial Technol.*, 41: 733–739.
- Singleton VL, Rossi JA. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambelison E, Dielbolt M, Andriantsitohaina R. (1999) Endothelial no release caused by red wine polyphenols. *J. Physiol. Pharmacol.*, 50: 535-540.
- Sudraud, P. (1958) Parameters of red wine quality. *Food Technol.* 33, 139-144.
- Todaro A., Palmeri R., Barbagallo R. N., Pifferi P. G. and Spagna G. (2008) Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using  $\alpha$ -glucosidase from various sources. *Food Chem.*, 107: 1570-1575.
- Valdés Sánchez y Regodón Mateos (1994) Elaboración de tintos en presencia de enzimas pectolíticas: Evolución de compuestos fenólicos. *Incidencia de atributos cromáticos*. *Alimentaria*, Junio, 63-68.