

# PRODUCCIÓN DE UNA ENDOPOLIGALACTURONASA DE *Saccharomyces bayanus* PARA SU APLICACIÓN EN LA ELABORACIÓN DEL ZUMO DE ARÁNDANOS.

Nuria Vieco Saiz, Alfonso Navarro Marzal<sup>1</sup>, Noelia Betoret Valls<sup>2</sup>.

## RESUMEN

Los tratamientos enzimáticos pectinolíticos son ampliamente utilizados en las industrias agroalimentarias, que hacen uso de preparados comerciales procedentes de cultivos de hongos filamentosos que contienen una gran diversidad de actividades adicionales. Sin embargo, es posible utilizar, con algunas ventajas, extractos de levadura con elevada actividad pectinasa. En este trabajo hemos caracterizado la actividad endopoligalacturonasa de la cepa de *Saccharomyces bayanus* CECT 1926 y de tres nuevas cepas desarrolladas a partir de ésta por evolución genómica (1926-12T, 1926-TP6, 1926-12T4PO) y que sobreexpresan el gen *PGU1* que codifica para una endopoligalacturonasa. El aumento de la actividad enzimática es de unas 23 veces cuando el promotor empleado es el del gen *PGK1*, y llega a aumentar hasta 30 veces en el caso de utilizar el promotor del gen *TDH3*.

Asimismo, hemos comparado el efecto de la actividad pectinolítica procedente de *S. bayanus* frente a la del preparado comercial multienzimático Viscozyme que procede de *Aspergillus aculeatus*, estudiando su influencia sobre los parámetros físico-químicos y las propiedades funcionales de un homogeneizado de arándanos. El tratamiento mediante Viscozyme es más efectivo en la reducción de la viscosidad del zumo resultante que el extracto enzimático procedente de *S. bayanus*. Sin embargo, éste resulta más eficaz en la preservación del color y de la capacidad antioxidante del zumo obtenido.

En términos globales, los resultados de este estudio preliminar avalan la hipótesis de la utilización de extractos de cultivos de levaduras como una alternativa a los tratamientos enzimáticos actualmente utilizados en las industrias de producción de zumos, presentando como ventajas una acción enzimática más dirigida y una mayor preservación del contenido de compuestos bioactivos.

## RESUM

Els tractaments enzimàtics pectinolítics són àmpliament utilitzats en les indústries agroalimentàries, que fan ús de preparats comercials procedents de cultius de fongs filamentosos que contenen una gran diversitat d'activitats addicionals. No obstant això, és possible utilitzar, amb alguns avantatges, extractes de rent amb elevada activitat pectinasa. En este treball hem caracteritzat l'activitat endopoligalacturonasa del cep de *Saccharomyces bayanus* CECT 1926 i de tres nous ceps desenvolupades a partir d'esta per

---

<sup>1</sup>Alfonso Navarro Marzal. Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia. c/ Doctor Moliner, 50. 46100 – Burjassot, Valencia (España).

<sup>2</sup>Noelia Betoret Valls. Instituto de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo. Camino de la Vera s/n. 46022 – Valencia (España)

evolució genòmica (1926-12T, 1926-TP6, 1926-12T4PO) i que sobreexpressen el gen *PGU1* que codifica per a una endopoligalacturonasa. L'augment de l'activitat enzimàtica és d'unes 23 vegades quan el promotor emprat és el del gen *PGK1*, i arriba a augmentar fins a 30 vegades en el cas d'utilitzar el promotor del gen *TDH3*.

Així mateix, hem comparat l'efecte de l'activitat pectinolítica procedent de *S. bayanus* enfront de la del preparat comercial multienzimàtic Viscozyme que procedeix d'*Aspergillus aculeatus*, estudiant la seua influència sobre els paràmetres fisicoquímics i les propietats funcionals d'un homogeneïtzat de nabius. El tractament per mitjà de Viscozyme es més efectiu en la reducció de la viscositat del suc resultant que l'extracte enzimàtic procedent de *S. bayanus*. No obstant això, este resulta més eficaç en la preservació del color i de la capacitat antioxidant del suc obtingut. En termes globals, els resultats d'este estudi preliminar avalen la hipòtesi de la utilització d'extractes de cultius de rents com una alternativa als tractaments enzimàtics actualment utilitzats en les indústries de producció de sucs, presentant com a avantatges una acció enzimàtica més dirigida i una major preservació del contingut de compostos bioactius.

## **ABSTRACT**

Pectinolytic enzymatic treatments are widely used in the agro-food industries, which use commercial preparations obtained from cultures of filamentous fungi containing a wide variety of additional activities. However, it is possible to use, with certain advantages, yeast extracts that contain high pectinase activity. In this paper we have characterized the endopolygalacturonase activity of the strain *Saccharomyces bayanus* CECT 1926 and that of three new strains which were developed from the former by means of genomic evolution (1926-12T, 1926-TP6, 1926-12T4PO), which overexpress the *PGU1* gene that codes for an endopolygalacturonase. The increase of the enzymatic activity is around 23 fold when using the *PGK1* promoter and rises up to 30 fold when the promoter used comes from the *TDH3* gene.

Additionally, we have compared the effects of the pectinolytic activity obtained from *S. bayanus* with that of the multienzymatic commercial preparation Viscozyme, obtained from *Aspergillus aculeatus*, by analyzing their influence on the physico-chemical parameters and the functional properties of homogenised blueberries. The use of Viscozyme is more effective at reducing the resulting juice's viscosity than the enzymatic extract obtained from *S. bayanus*. However, the latter is more effective at preserving the colour and the antioxidant capacity of the resulting juice.

In global terms, the results of this preliminary study endorse the hypothesis that extracts obtained from cultures of yeasts may be an alternative to the current enzymatic treatments used in the juicemaking industries, offering the advantages of a more directed enzymatic action and a better preservation of the bioactive compounds' content.

**PALABRAS CLAVE:** Endopoligalacturonasa, *Saccharomyces*, *PGU1*, Pectina, Arándano.

## INTRODUCCIÓN

Las pectinas son un componente estructural mayoritario en las paredes celulares de los tejidos vegetales. Tienen una estructura compleja formada por bloques de homogalacturonano, que consiste en uniones  $\alpha$  (1,4) de residuos de ácido D-galacturónico, y ramnogalacturonano, formado por repeticiones diméricas de  $\alpha$  (1,2)-L-ramnosa- $\alpha$ (1,4) ácido D-galacturónico (Van Pouderoyen *et al.* 2003).

En las industrias de zumos de frutas como el arándano, la cereza, la manzana, la pera o la uva, y en el proceso de elaboración de vinos, la presencia de estos polisacáridos genera problemas relacionados, fundamentalmente, con el aumento de la viscosidad, lo que trae consigo una disminución del rendimiento en zumo, mayor dificultad en los procesos de clarificación y filtración, un menor contenido en componentes antioxidantes y una pérdida de calidad en el producto final. En este sentido, la utilización de pectinasas asegura una disminución de la turbidez y evita la precipitación de las partículas en suspensión (Blanco, *et al.*, 1999; Sakai, *et al.*, 1993).

Cabe resaltar que el 25% de las ventas globales de enzimas de uso alimentario corresponde a pectinasas microbianas (Jayani, *et al.*, 2005). La mayoría de los preparados comerciales pectinolíticos (mezclas de pectinasas) que se usan en la industria alimentaria provienen de *Aspergillus niger* (Naidu y Panda 2003), ya que además de ser un microorganismo considerado GRAS (Generally Recognized As Safe), produce grandes cantidades de estas enzimas. Uno de los inconvenientes de utilizar estos preparados comerciales, es que contienen una mezcla de enzimas de distinta naturaleza, entre éstas podemos encontrar arabinofuranosidasas, enzimas que generan una turbidez que no interesa (Fernandez-Gonzalez, *et al.*, 2005), al hidrolizar residuos no reductores de arabinósidos, que forman parte de hemicelulosas; y provocar una colmatación rápida de los filtros en el procesado de zumos.

El uso de levaduras, especialmente las del género *Saccharomyces*, para la producción de enzimas pectinolíticos, puede resultar interesante al ser el grupo de microorganismos más empleado en este planeta desde el punto de vista económico (Arévalo-Villena, *et al.*, 2011; Stewart, 2014). Además, ofrece muchas ventajas al ser un microorganismo de fácil cultivo, unicelular, que tiene un ciclo de reproducción conocido, un sistema genético bien caracterizado, la existencia de procedimientos de transformación eficaces, la presencia de numerosas cepas mutantes auxotróficas y la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau, 2000).

Las pectinasas fúngicas son normalmente enzimas exocelulares de naturaleza glicoproteica. La principal enzima pectinolítica proveniente de levaduras presenta el modo de actuación típico de una endopoligalacturonasa (endoPG), enzima capaz de hidrolizar los enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1,4) en las regiones de homogalacturonano de la pectina (Van Pouderoyen, *et al.* 2003) y por ende, reducir la viscosidad de zumos y vinos. El producto final de las reacciones enzimáticas son siempre oligosacáridos (Blanco, *et al.*, 1999).

En *Saccharomyces*, la endoPG es codificada por el gen *PGU1*, localizado en una posición subtelomérica en el cromosoma X. Se sabe que la presencia

de este gen en las cepas de *Saccharomyces* es variable, y que presenta un patrón de expresión complejo, regulado por diferentes factores que actúan a múltiples niveles y de manera diferente en las distintas cepas estudiadas (Louw, *et al.*, 2010). El gen *PGU1* ha sido secuenciado, clonado y sobreexpresado a partir de cepas de diferentes especies del género *Saccharomyces*, como *cerevisiae*, *bayanus* o *paradoxus*. Recientemente se ha descrito su sobreexpresión en la cepa de *S. bayanus* CECT 1926, a partir del gen *PGU1* de dicha cepa, y mediante un novedoso procedimiento de cisgénesis, denominado evolución genómica mediante diseño molecular, se han generado tres nuevas cepas portadoras de diferentes reordenaciones cromosómicas con mayor capacidad pectinolítica (Sani, 2013).

El planteamiento inicial del trabajo es el de cuantificar las diferencias en la actividad enzimática entre las distintas cepas recombinantes de levadura que sobreexpresan el gen *PGU1*. Sin embargo, los métodos de determinación de actividad pectinolítica publicados hasta la fecha y basados en la medida de los azúcares reductores liberados, solo permiten una muy basta comparación relativa entre muestras y no una verdadera cuantificación, lo que exige poner a punto unas nuevas condiciones de determinación de la actividad enzimática.

Con el fin de determinar la posibilidad de utilización de estas cepas en los procesos de despectinización de zumos a nivel industrial, se realizó la cuantificación de la actividad enzimática de un preparado comercial y se comparó el efecto de estas dos fuentes alternativas de actividad pectinolítica, la comercial procedente de un hongo filamentoso y la recombinante a partir una levadura, sobre las propiedades físico-químicas y funcionales de un zumo de frutas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

#### **MATERIAL BIOLÓGICO**

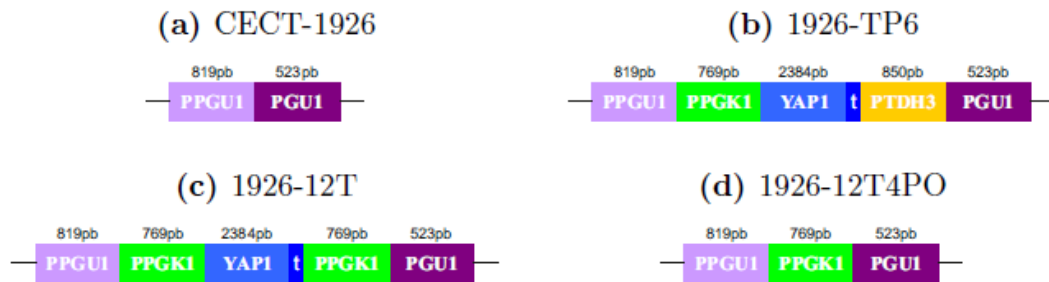
Las cepas de levaduras utilizadas corresponden a *Saccharomyces bayanus* CECT 1926 (Figura 1,a) y tres de sus variantes obtenidas por medio de la técnica de evolución genómica (Sani, 2013): 1926-12T, 1926-TP6 y 1926-12T4PO.

- 1926-TP6. Cepa 1926 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen *YAP1* y donde se ha sustituido una copia del promotor del gen *PGU1* por el promotor del gen *TDH3* (Figura 1, b).

- 1926-12T. Cepa 1926 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen *YAP1* y donde se ha sustituido una copia del promotor del gen *PGU1* por el promotor del gen *PGK1*. (Figura 1, c).

- 1926-12T4PO. Cepa 1926 donde se ha sustituido una copia del promotor del gen *PGU1* por el promotor del gen *PGK1* (Figura 1, d)

-



**FIGURA 1.** Representación de la ordenación genómica de las cepas utilizadas (Sani, 2013).

En los ensayos de aplicación se utilizaron arándanos (*Vaccinium myrtillus*) adquiridos en el mercado local.

## MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose): medio de uso rutinario que aporta todos los nutrientes necesarios para que la levadura crezca. Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g	(1 %, p/v)
Peptona	20 g	(2 %, p/v)
Glucosa	20 g	(2 %, p/v)
Agar bacteriológico	20 g	(2 %, p/v)
Agua bidestilada	c.s.p. 1L	

- Medio definido con ácido poligalacturónico 2 % (p/v) (YPA): Este medio se utilizó para la determinación en placa de la actividad endopoligalacturonasa de las cepas de levadura.

Primero se autoclavó una solución de agar bacteriológico (15 g en 360 mL de agua bidestilada, 1,5 %, p/v). Una vez esterilizada se le añadió:

Glucosa 20 % (p/v)	25 mL	(0,5 %, p/v)
Yeast Nitrogen Base (YNB) al 7% (p/v) sin aminoácidos y con sulfato amónico	100 mL	(0,7 %, p/v)

Por otro lado, se autoclavó la parte restante del agua para obtener 1 L de medio, junto con el ácido poligalacturónico (20 g, 2 %, p/v). Una vez preparadas, se mezclaron las dos soluciones y el medio resultante se vertió en placas Petri.

- WLNA (WL Nutrient Agar; Pronadisa): Este medio se utilizó para el recuento en placa de levaduras.

Dextrosa	50 g/L	Sulfato magnésico	0,125 g/L
Triptona	5 g/L	Bromocresol verde	0,022 g/L
Extracto de levadura	4 g/L	Cloruro férrico	0,0025 g/L
Fosfato monopotásico	0,55 g/L	Sulfato de manganeso	0,0025 g/L
Cloruro de potasio	0,425 g/L	Agar bacteriológico	15 g/L

Cloruro cálcico 0,125 g/L

## ENZIMAS COMERCIALES Y SUSTRATO

Como fuente de enzimas procedentes de *Aspergillus* se utilizó el preparado enzimático comercial Viscozyme (Novozymes Corp.); complejo multi-enzimático de *Aspergillus aculeatus* que degrada las paredes celulares que integran los tejidos vegetales. Contiene actividades endo  $\beta$ -glucanasas, endo (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucanasas, celulasas, hemicelulasas y xilanasas. Su temperatura óptima está comprendida entre 50 – 60 °C.

Como sustrato para las medidas de actividad enzimática se utilizó la sal sódica del ácido poligalacturónico proveniente de cítricos (Sigma-Aldrich Co., LLC).

## Métodos

### CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de levadura se mantuvieron congeladas a -86 °C en medio YPD con una concentración de glicerol del 15%, hasta su utilización. Para su empleo, se inoculó una alícuota del medio congelado en medio líquido YPD, que se incubó a 30 °C, con una agitación de 200 r.p.m. en un agitador orbital C25 Incubator Shaker” (New Brunswick Scientific, EE. UU.) durante unas 18 horas. Al día siguiente, el cultivo líquido se estirió en placas de WLNA y de ahí se tomó una colonia aislada para introducirla en el medio de cultivo donde, tras su incubación en las mismas condiciones, se determinó: la actividad enzimática, el recuento celular total en cámara de Thoma y el recuento de células viables mediante la siembra de diluciones decimales seriadas en placas de WLNA.

### VALORACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD EndoPG

Para determinar cualitativamente la actividad endoPG se partió de cultivos líquidos de las cepas de interés, crecidos durante 48 horas, y se transfirieron aproximadamente 3  $\mu$ L de cada cultivo con la ayuda de un replicador (Sigma-Aldrich Co., LLC) a placas de medio YPA, que se incubaron durante 2 días a 30 °C. La actividad de la enzima endoPG se valoró cualitativamente añadiendo HCl 6 N sobre la placa y midiendo el diámetro del halo de degradación ( $D_h$ ) del ácido poligalacturónico, según lo descrito por Blanco, *et al.* (1994). Se compararon los diámetros de los halos de degradación entre las distintas cepas utilizando la ecuación (1):

$$A_r = \frac{(D_h - D_{h\ 1926})}{D_{h\ 1926}} \quad (1)$$

Siendo  $A_r$  el aumento relativo del diámetro de degradación con respecto al producido por la cepa parental 1926 que puede considerarse como un indicador indirecto de la actividad enzimática.

#### DESALADO DE MUESTRAS MEDIANTE FILTRACIÓN EN GEL:

La presencia de restos de azúcares reductores y otros compuestos de bajo peso molecular interferían en la medida de la actividad enzimática. Por tanto fue necesario proceder al desalado de las muestras procedentes del sobrenadante del medio de cultivo donde se sembraron las cepas de levadura.

Una vez eliminadas las células por centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 30 segundos en una minicentrífuga MiniSpin® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), se determinaba la concentración de proteína en el sobrenadante y éste se sometía a un proceso de filtración en gel. Para ello se prepararon columnas de 1mL utilizando jeringas de insulina, que se rellenaron con Sephadex® G-25 fino (Sigma-Aldrich Co. LLC), utilizando el procedimiento descrito por Penefski (1977) con las modificaciones que se describen a continuación. Las columnas rellenas se equilibraron pasando 3 volúmenes de tampón acetato 62,5 mM (pH = 4,5). Estas columnas se compactaban centrifugándolas a 1.500 x g durante 1 minuto en una centrífuga de rotor basculante (P-SELECTA Centronic-BLII). A continuación, se depositaban 100 µL del sobrenadante en la parte superior del lecho cromatográfico y se eluían por centrifugación a 1.500 x g durante 2 minutos. El eluido de la columna de filtración en gel contenía el extracto enzimático sobre el que se determinaba la actividad endoPG.

#### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

El contenido en proteínas se determinó antes y después de la filtración en gel mediante el método de Bradford (1976) utilizando como estándar albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Co. LLC). Para esta determinación, se hizo reaccionar 1 mL de muestra (previamente diluida 1:100) con 1 mL del reactivo de Bradford y, tras un intervalo de 5 minutos, la absorbancia se midió a 595 nm. Esta determinación de proteínas permitió conocer el porcentaje de pérdidas después de la etapa de filtración en gel, ya que una parte de las proteínas quedan retenidas en la columna. Este dato fue utilizado como factor de corrección en las determinaciones posteriores de la actividad enzimática.

#### VALORACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD EndoPG

Para el ensayo enzimático se preparó una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 250 µL: tampón acetato a una concentración final de 62,5 mM (pH = 4,5), ácido poligalacturónico como sustrato a una concentración final de 1,25 % (p/v), y una alícuota del extracto enzimático obtenido tras realizar la filtración en gel en un volumen que oscilaba, según la cepa de levadura, entre 5 y 25 µL. La mezcla de reacción se incubó a una temperatura de 45 °C y una agitación de 300 r.p.m. en un incubador-agitador Thermomixer Confort (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 20 µL, que se diluyeron 100 veces en tampón

bicarbonato 0,8 M (pH=10) a 0 °C, para detener la reacción. En la muestra diluida 100 veces en tampón bicarbonato se determinaron los azúcares reductores generados por la acción enzimática.

El valor de la pendiente ( $m$ ) en el origen de las curvas obtenidas al representar la producción de azúcares reductores en función del tiempo de incubación para cada uno de los ensayos enzimáticos, permite calcular la actividad enzimática ( $AE$ ) a partir de la ecuación (2):

$$AE = \left(\frac{m}{V}\right) \cdot f_g \cdot pp \cdot e \quad (2)$$

donde:  $V$  = volumen del extracto enzimático ( $\mu\text{L}$ );  $f_g$  = factor de dilución al realizar la filtración en gel;  $e$  = factor de corrección debido a los volúmenes del ensayo y  $pp$  = factor de corrección para la pérdida de proteína. Los resultados obtenidos se expresan en unidades de actividad enzimática (UA), definiéndose 1 UA como la producción de un  $\mu\text{g}$  de ácido galacturónico por minuto y  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo.

La determinación cuantitativa de la actividad endopoligalacturonasa se basó en la medida de los azúcares reductores generados, empleando los siguientes métodos:

1. Método del ácido dinitrosalicílico o del DNS (Wood *et al.*, 2012). El reactivo contiene: Sal Rochelle (30 g/L), DNS (10 g/L) y NaOH (4 g/L). Se realizó una dilución 1:20 de la alícuota tomada del cóctel de la actividad enzimática, con el reactivo DNS y se incubó en un baño a 0 °C durante 10 minutos para detener la actividad enzimática. La reacción entre los azúcares reductores de la muestra y el DNS transcurre a 99 °C durante 7 minutos. Se dejó enfriar 5 minutos a 20 °C. La absorbancia se midió a 580 nm.

2. Método del ácido bicinconínico o del BCA (McIntyre *et al.*, 2013). Se prepararon dos soluciones stock siguiendo el método de García *et al.*, (1993). Una solución A compuesta por  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (54,28 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (24,2 g/L) y 2,2'-bicinconinato de sodio (1,942 g/L). La solución B se preparó disolviendo  $\text{CuSO}_4$  pentahidratado (1,248 g/L) y L-serina (1,262 g/L). Ambas soluciones se conservaron en oscuridad y refrigeración. En el momento del análisis, la solución A y la B se mezclaron en partes iguales (1:1) para obtener la solución C. 500  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida en tampón bicarbonato que se obtenía tras el ensayo enzimático, se mezclaban con 500  $\mu\text{L}$  de la solución C para determinar el contenido de azúcares reductores. La reacción se desarrolla durante 30 minutos a 80 °C y, a continuación, se enfría a 20 °C durante 5 minutos. La absorbancia se midió a 560 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter modelo DU 730.

Para la determinación cuantitativa de la actividad enzimática del preparado comercial Viscozyme, se preparó el mismo cóctel que para las levaduras, inoculando 15  $\mu\text{L}$  de Viscozyme al 0,05 % (p/v). El resto del procedimiento era el mismo que para las muestras de los sobrenadantes de cultivo de las levaduras.



## DETERMINACIONES FISICO-QUÍMICAS

Se trituraron mediante una batidora, 300 gramos de arándanos que se trataron, o bien con el sobrenadante de un cultivo de 48 horas de la cepa de *S. bayanus* 1926-12T4PO a una concentración final de 0,2 % (v/p) a una temperatura de 25 °C, o con una disolución de Viscozyme a una concentración final de 0,1 % (v/p) y a una temperatura de 50 °C. El tratamiento se realizó a las temperaturas indicadas, tomando muestra a 0, 60 y 150 minutos para el posterior análisis físico-químico.

**Reología:** Se utilizó un Reómetro Rotatorio (Haake Rheostress 1, Estados Unidos) en el modo de Control de Velocidad (CR: Control Rate), con los accesorios de cilindros concéntricos (Z34 DIN 53019). Se aplicó un gradiente de velocidad creciente de 0 a 250 s<sup>-1</sup>. La temperatura de trabajo se seleccionó a 20 °C. El comportamiento reológico de las muestras fue modelizado utilizando el modelo de Ostwald-de-Waele. El índice de consistencia ( $K = [\text{Pa}\cdot\text{s}^n]$ ) y el índice de comportamiento al flujo ( $n = [\text{adimensional}]$ ) del modelo fueron obtenidos por regresión lineal de los valores experimentales.

**Color:** Para medir el color se utilizó un espectrocolorímetro (CM-3600d, Minolta Co. Ltd., Japón), que se calibró sobre fondo blanco y fondo negro. Las muestras se colocaron en cubetas plásticas de 25 mL y 2 cm de paso óptico. Los resultados se expresaron en el espacio de color CIE L\*a\*b\* para el iluminante D65 y un ángulo del observador de 10° sin incluir el componente especular (SCE/0). Se tomaron las medidas sin tener en cuenta el brillo ni la luz ultravioleta.

**Propiedades funcionales:** Se determinó el contenido total en fenoles por el método de Folin-Ciocalteu (FC) descrito por Waterhouse (2003). Las antocianinas monoméricas totales y el índice de color polimérico se determinaron mediante las metodologías descritas por Giusti y Wrolstad (2001).

En todas las determinaciones se realizó un análisis estadístico de los resultados mediante un análisis multifactorial de la varianza utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion®.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa de las distintas cepas.**

Los halos de degradación alrededor de la colonia indican que las cepas presentan actividad pectinolítica extracelular. El diámetro del halo ( $D_h$ ) puede utilizarse como un indicador cualitativo de la actividad endoPG que presentan las cepas. En la Figura 2 se observan los halos de degradación del ácido poligalacturónico producidos por las distintas cepas con actividad endoPG. Podemos ver que las cepas recombinantes presentan mayor actividad que la cepa parental 1926. El diámetro de los diferentes halos, junto con su aumento relativo con respecto a 1926 ( $A_r$ ) se muestran en la Tabla 1. Puede apreciarse

que la cepa 1926-TP6 presenta un diámetro de halo mayor, y que no hay diferencias significativas entre las cepas 1926-12T y 1926-12T4PO.



**FIGURA 2.** Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa en YPA.

**TABLA 1.** Diámetro de los halos de degradación de las distintas cepas analizadas ( $D_h$ ) y aumento relativo ( $A_r$ ) del diámetro con respecto a la cepa parental (1926).

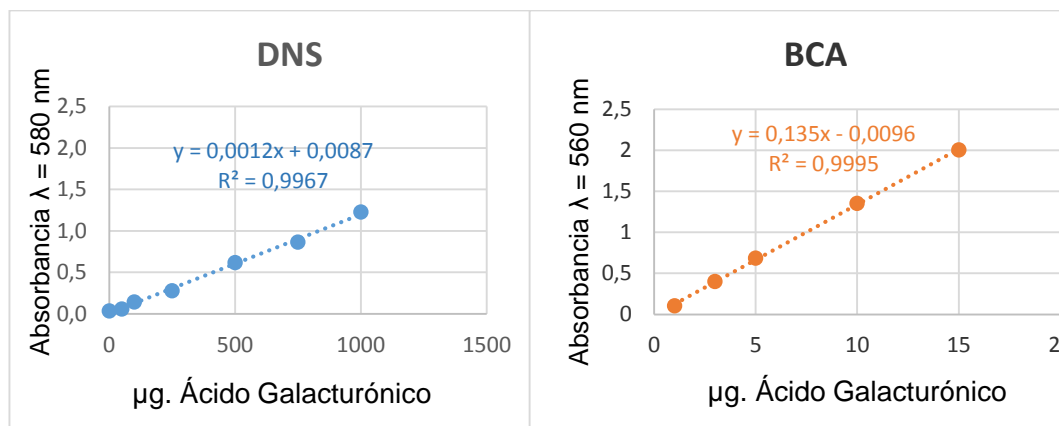
Cepas	1926	1926-TP6	1926-12T	1926-12T4PO
$D_h$ (mm)	$11,568 \pm 0,106^a$	$28,29 \pm 0,94^b$	$25,63 \pm 1,74^c$	$25,82 \pm 1,56^c$
$A_r$	-	1,45	1,22	1,23

Para una misma variable letras diferentes en los superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

### Determinación cuantitativa de la actividad endopoligalacturonasa de las distintas cepas de *S. bayanus*.

Si bien, el método del DNS ha sido el método tradicionalmente usado para determinar los azúcares reductores producidos en este tipo de ensayos (Miller, 1995; Arévalo-Villena, *et al.*, 2011; Wood, *et al.*, 2012), y aunque los dos métodos de medida de azúcares reductores, el del DNS y el del BCA, presentan una buena correlación entre la concentración de ácido galacturónico y la absorbancia de las muestras (Figura 3), se eligió emplear el método del BCA. La razón estriba en la mayor pendiente asociada a la recta de calibrado obtenida por el método del BCA, que revela una sensibilidad 100 veces mayor, por lo que pequeñas diferencias en la cantidad de ácido poligalacturónico degradado se traducen en una mayor diferencia en la absorbancia. Por tanto, mediante el método del BCA es posible medir la producción inicial de azúcares reductores cuando todavía es alta la concentración de sustrato, lo que permite medir la velocidad inicial de la reacción enzimática, al contrario de lo que sucede con las metodologías

empleadas en las publicaciones que han aparecido hasta la fecha sobre este tema.



**FIGURA 3.** Curvas de calibrado obtenidas en la determinación de azúcares reductores por los métodos DNS y BCA.

Teniendo en cuenta la elevada sensibilidad del método elegido y con el fin de eliminar las posibles interferencias por la presencia de otros azúcares reductores en los extractos enzimáticos, se llevó a cabo un desalado de los mismos mediante filtración en gel. El proceso de filtración en gel, si bien permitió realizar las medidas al eliminar el ruido de fondo, ocasionó las pérdidas de proteínas que se indican en la Tabla 2.

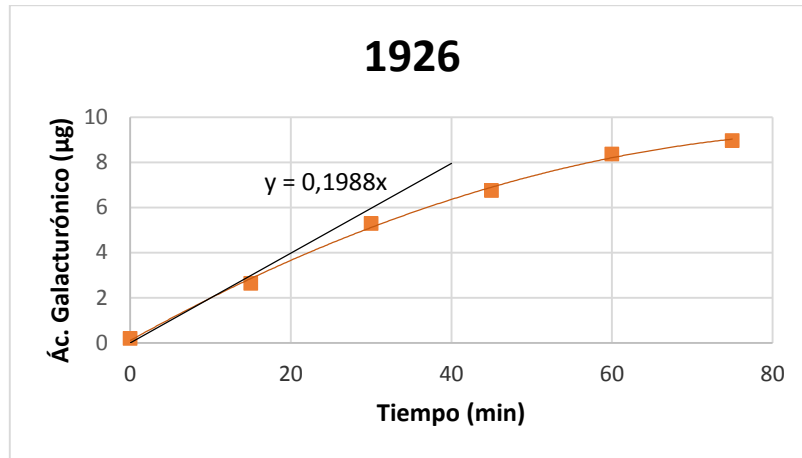
**TABLA 2.** Cantidad de proteína antes y después de la filtración en gel.

Cepa	Proteína inicial (µg.)	Proteína final (µg.)	Pérdida (%)
<b>1926</b>	270,62	96,64	35,71
<b>12T4PO</b>	313,47	150,98	48,16
<b>TP6</b>	288,34	130,26	45,18
<b>12T</b>	244,24	128,96	52,80

Purificado el extracto enzimático, se valoró la actividad enzimática de las diferentes cepas mediante el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos. Con el método del BCA se realizaron las medidas oportunas generándose las curvas de liberación de azúcares reductores en función del tiempo.

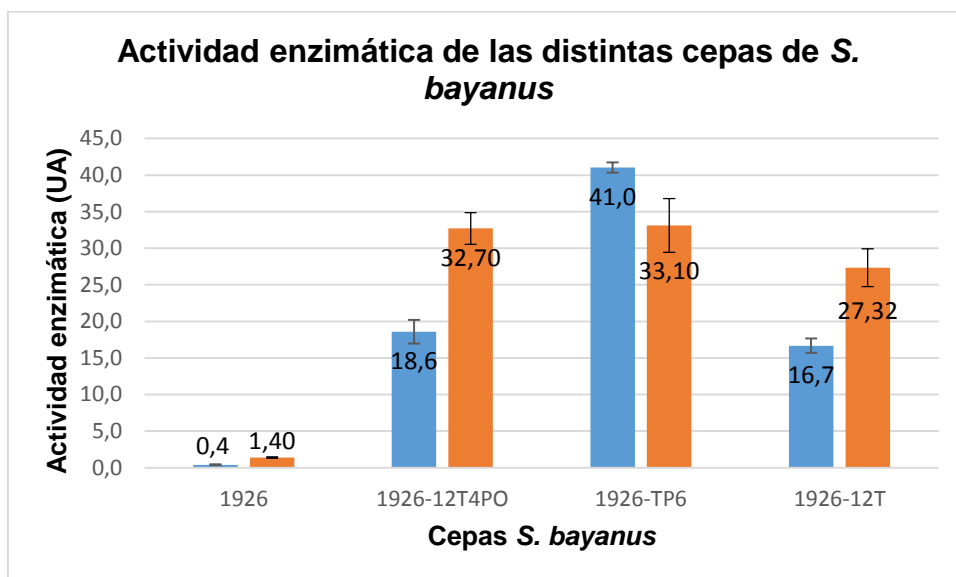
Una vez representadas las curvas de liberación de azúcares reductores, para el cálculo de la actividad enzimática se determinó la pendiente de la recta tangente a la curva en el origen de coordenadas (Figura 4). La baja solubilidad y la elevada viscosidad de las disoluciones de ácido poligalacturónico limita la concentración del mismo en el cóctel de medida de la actividad. Este hecho hace que esta pendiente corresponda al momento de mayor concentración de sustrato que es factible alcanzar, y, por tanto, de la máxima velocidad de la enzima bajo las condiciones del ensayo. Con esta optimización de la metodología se logra subsanar los errores que se generan al medir la liberación de azúcares reductores a un tiempo fijo y prolongado, tal y como se

ha descrito en los trabajos publicados hasta la fecha (Sieiro, *et al.*, 2003; Arévalo-Villena, *et al.*, 2011; Jia, *et al.*, 2000), pues como nuestros resultados demuestran la velocidad de la reacción varía rápidamente con el tiempo.



**FIGURA 4.** Producción de azúcares reductores por acción de una endopoligalacturonasa sobre el ácido poligalacturónico. Para el cálculo de la actividad enzimática se determina la pendiente de la recta tangente a la curva en el origen de coordenadas y se introduce en la ecuación (2).

Se observa que las cepas modificadas por evolución genómica presentan una mayor actividad enzimática que la cepa parental 1926 (Figura 5); esto se debe a que en las cepas recombinantes se ha cambiado el promotor original del gen *PGU1* por promotores fuertes, como el promotor del gen de la fosfogliceratoquinasa (*PGK1*) (cepas 12T y 12T4PO) o el promotor del gen *TDH3*. El gen *PGK1* es uno de los genes que más fuertemente se expresan en levaduras durante el proceso de fermentación. Éste presenta una expresión alta en presencia de glucosa, y es reprimido por otras fuentes de carbono como el acetato o piruvato (Kigsman, *et al.*, 1990).



**FIGURA 5.** Actividad endopoligalacturonasa de las distintas cepas de *S. bayanus* a las 24 y 48 horas. Una unidad de actividad enzimática (UA) se define como la producción de un  $\mu\text{g}$  ácido galacturónico por minuto y  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo.

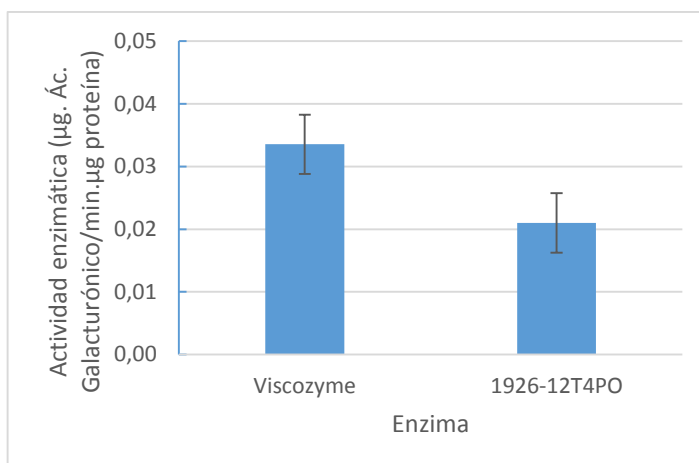
Entre las cepas modificadas se observa una mayor actividad en la cepa 1926-TP6 a las 24 horas. Esta cepa tiene como promotor del gen *PGU1* al promotor del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*TDH3*), gen implicado en la glicólisis y la gluconeogénesis (YeastGenome, 2014). *TDH3* se detecta en células en crecimiento exponencial (Delgado, *et al.*, 2001) y, de acuerdo con los datos obtenidos, resulta ser un promotor más fuerte que el de la *PGK1* a la hora de estimular la transcripción del gen *PGU1* en el fondo genético de la cepa 1926, resultado coherente con los datos presentados en la Tabla 1.

### **Comparación del efecto del extracto enzimático de la cepa 1926-12T4PO y Viscozyme sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de arándanos.**

En una primera aproximación, y con la finalidad de tener una idea de la posibilidad de utilización de las cepas seleccionadas en la despectinización industrial del zumo de arándanos, se comparó el efecto sobre las propiedades físico-químicas y funcionales de la utilización del extracto de la cepa 1926-12T4PO en relación con la utilización del preparado enzimático comercial.

Se realizaron medidas tanto de propiedades físico-químicas (reología, color) como funcionales (fenoles totales, antocianinas monoméricas e índice de color polimérico) de las muestras, ya que las propiedades reológicas resultantes y el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos determinarán la calidad del zumo obtenido.

Para determinar cuánto extracto de levadura se debía inocular al ensayo, se comparó su actividad endopoligalacturonasa con la del preparado comercial Viscozyme (Figura 7). Buscando el mismo nivel de actividad, la suspensión de Viscozyme se añadió al 0,1 % (v/p) (concentración recomendada para el preparado), y el extracto enzimático procedente del sobrenadante del cultivo de la levadura se adicionó al 0,2 % (v/p).



**FIGURA 7.** Determinación de la actividad específica del preparado comercial Viscozyme y del sobrenadante de la cepa 1926-12T4PO.

### **Efecto sobre las propiedades físico-químicas**

La viscosidad es un parámetro importante en la industria del zumo y pulpa, ya que al aumentar puede interferir en la velocidad de flujo dentro del equipo. En solución acuosa, las pectinas pueden favorecer un aumento de la viscosidad incluso a bajas concentraciones, dependiendo del grado de metoxilación que presenten (Löfgren & Hermansson, 2007) dando complejos patrones de flujo.

Cuando las frutas son despectinizadas o si el contenido en pectinas es bajo, sus zumos presentan generalmente un comportamiento newtoniano. Los zumos de melocotón, cereza o naranja son un ejemplo de zumos que presentan este comportamiento (Ibarz, A. *et al.*, 1992; Ibarz, A. *et al.*, 1994; Giner, J. *et al.*, 1996)

En las curvas obtenidas en los ensayos reológicos realizados, se puede observar que ambos tratamientos permiten obtener zumos con comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ) aunque los tratados con Viscozyme se acercan más a un comportamiento newtoniano (Tabla 3). En términos del índice de consistencia (K), en las muestras tratadas con el extracto proveniente de la cepa 1926-12T4PO, los valores de K son más elevados que en el tratamiento con Viscozyme. Esto se debe a que la extensión del tratamiento enzimático no ha sido suficiente como para hidrolizar los enlaces de todas las cadenas de pectinas. La reducción considerable de la temperatura de trabajo (en el ensayo con Viscozyme se trabajó a 50 °C y en el caso de la levadura a 25 °C) podría influir en este resultado, introduciendo la necesidad de utilizar los extractos enzimáticos de levadura en una dosis mayor. Naidu y Panda (2003) mostraron que las enzimas pectinolíticas presentes en los extractos son más estables que las enzimas parcialmente purificadas y que esto podría ser debido a las interacciones con otras proteínas y enzimas secretadas por el microorganismo

**TABLA 3.** Índice de consistencia (K) e índice de comportamiento al flujo (n) obtenidos para el zumo tratado con las diferentes fuentes de enzimas a los dos tiempos estudiados.

Enzima	Tiempo (min)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (adimensional)
1926-12T4PO	60	11.1±0.7	0,284±0.512
	150	12,6±0.9	0,2136±0.4105
Viscozyme	60	0,0014±0,0008	0,94±0.14
	150	0,002±0.003	1.0±0.5

El análisis de color se realizó al ser uno de los parámetros más importantes en la decisión del consumidor de aceptar o rechazar un producto, además de tener una relación directa con la calidad nutricional o el estado sanitario (Chiralt, A. *et al.*; 2007). Las diferencias de color se calcularon con respecto a la fruta triturada, sin tratamiento enzimático (Tabla 4).

**TABLA 4:** Medidas de color realizadas en los distintos tratamientos.

	Tiempo	L*	a*	b*	C*	h	ΔE
Fruta triturada	60	13,47 ± 0,49 <sup>a</sup>	17,935 ± 0,942 <sup>a</sup>	3,41 ± 0,39 <sup>a</sup>	19,22 ± 0,61 <sup>a</sup>	10,463 ± 0,176 <sup>a</sup>	-
	150	16,53 ± 0,44 <sup>b</sup>	11,209 ± 0,345 <sup>b</sup>	5,14 ± 0,48 <sup>b</sup>	12,46 ± 0,51 <sup>b</sup>	24,109 ± 0,381 <sup>b</sup>	-
Tratamiento con 1926-12T4PO	60	7,23 ± 0,06 <sup>c</sup>	13,97 ± 0,23 <sup>c</sup>	2,320 ± 0,114 <sup>c</sup>	14,16 ± 0,22 <sup>c</sup>	9,43 ± 0,56 <sup>c</sup>	7,99 ± 0,10 <sup>a</sup>
	150	6,57 ± 0,08 <sup>c</sup>	13,32 ± 0,25 <sup>d</sup>	2,43 ± 0,38 <sup>d</sup>	13,55 ± 0,19 <sup>d</sup>	10,36 ± 1,78 <sup>d</sup>	10,49 ± 0,21 <sup>b</sup>
Tratamiento con Viscozyme	60	6,27 ± 0,03 <sup>c</sup>	11,64 ± 0,15 <sup>e</sup>	0,77 ± 0,05 <sup>e</sup>	11,67 ± 0,15 <sup>e</sup>	3,79 ± 0,18 <sup>e</sup>	10,51 ± 0,10 <sup>c</sup>
	150	7,79 ± 0,05 <sup>c</sup>	10,58 ± 0,09 <sup>f</sup>	0,2 ± 0,2 <sup>f</sup>	10,59 ± 0,09 <sup>f</sup>	1,048 ± 1,186 <sup>f</sup>	10,01 ± 0,14 <sup>d</sup>

L\*: índice de luminosidad; a\*: coordenada de color del eje verde-rojo; b\*: coordenadas de color del eje azul-amarillo; C\*: saturación o intensidad del color percibido; h: tonalidad del color percibido. ΔE: diferencia global de color. Dentro de una misma columna, letras diferentes en los superíndices indican diferencias estadísticamente significativas.

El análisis ANOVA multifactorial para la diferencia global de color indica que tanto la fuente de enzima como el tiempo de tratamiento influyen de manera significativa. Además, la forma en que afecta el tiempo de tratamiento es diferente para cada uno de los tratamientos enzimáticos utilizados.

Las diferencias significativas que se observan en la diferencia global de color vienen provocadas por diferencias estadísticamente significativas en todas las variables de color implicadas. Puede observarse que en todos los casos la luminosidad sufre un descenso significativo con respecto a la fruta triturada, y la intensidad del color percibido disminuye con el tiempo de tratamiento, siendo el descenso mucho más pronunciado con el tratamiento con Viscozyme. En cuanto a la tonalidad, las diferencias se manifiestan en una evolución a colores azules en las muestras tratadas con Viscozyme y una

evolución a colores rojizos en las muestras tratadas con enzimas provenientes de 1926-12T4PO.

### Efecto sobre las propiedades funcionales

El efecto de las operaciones de procesado sobre la capacidad antioxidante de diferentes componentes presentes en los zumos de frutas (Lee *et al.* 2002; Rossi *et al.* 2003) y la importancia de los mismos en la calidad funcional del producto final, exige determinar el efecto de los tratamientos con las diferentes fuentes de enzima (Castagnini, 2014)

Se decidió determinar el contenido de antocianinas monoméricas, el índice de color polimérico (también llamado contenido de antocianinas poliméricas) y los fenoles totales (Tabla 5).

Según Kalt y Dufour (1997), Stojanovic y Silva (2007), y Müller *et al.* (2010), las antocianinas contribuyen más a la actividad antioxidante que otros compuestos fenólicos. Éstas son especialmente relevantes debido, no solo a que poseen una muy alta capacidad antioxidante (Rice-Evans *et al.* 1995; Seeram and Nair 2002); sino porque también se les atribuyen propiedades anticancerígenas (Kalt y Dufour 1997). Otros compuestos que afectan a la capacidad antioxidante son los compuestos fenólicos que además contribuyen a las propiedades sensoriales (Sandri, I.G. *et al.*, 2013).

**TABLA 5:** Efecto del tipo y del tiempo de tratamiento sobre el contenido de antocianinas y fenoles.

Tratamiento con	Muestra	Antocianinas monoméricas (mg/g fruta)	Antocianinas poliméricas (%)	Fenoles (mg GAE/g fruta)
1926-12T4PO	Fruta fresca	1,08 ± 0,07 <sup>a</sup>	n.d.	2,52 ± 0,03 <sup>a</sup>
	60min	0,24 ± 0,02 <sup>b</sup>	13,56 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,61 ± 0,04 <sup>b</sup>
	150min	0,33 ± 0,12 <sup>c</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,07 <sup>c</sup>
Viscozyme	Fruta fresca	1,00 ± 0,06 <sup>d</sup>	n.d.	2,29 ± 0,03 <sup>d</sup>
	60min	0,1492 ± 0,0105 <sup>e</sup>	50,36 ± 1,14 <sup>c</sup>	1,16 ± 0,02 <sup>e</sup>
	150min	0,076 ± 0,007 <sup>f</sup>	39,4 ± 0,7 <sup>d</sup>	1,40 ± 0,02 <sup>f</sup>

Las antocianinas monoméricas están expresadas en mg cianidina-3-glucósido/gramo de fruta, cuando las medidas se realizan en fruta fresca, y en mg cianidina-3-glucósido/mL de zumo, cuando las medidas corresponden a muestras tratadas enzimáticamente. El índice de color polimérico está expresado en porcentaje y los fenoles totales en mg GAE (Equivalentes de Ácido Gálico)/gramo de fruta fresca y/o mg GAE/mL de zumo. Dentro de una misma columna, letras diferentes en los superíndices indican diferencias estadísticamente significativas. n.d.: no determinado

El análisis estadístico reveló que tanto la fuente de enzima como el tiempo de tratamiento influyen de forma significativa en el contenido en antocianinas monoméricas, en los fenoles totales y en el índice de color polimérico.

Las diferencias que se pueden observar entre la fruta triturada y el zumo que se obtiene tras los distintos tratamientos enzimáticos se deben, en parte,



a que durante el proceso de elaboración del zumo de arándanos, el contenido de antocianinas siempre se reduce significativamente (Lee *et al.* 2002; Rossi *et al.* 2003). Sin embargo, se observa una mayor reducción de éstas en el caso de Viscozyme, probablemente debido a la presencia de enzimas glicosidasas que degradarían las antocianinas liberadas y al efecto de la mayor temperatura de trabajo.

Cuando se procesa fruta para elaborar zumos, el valor de antocianinas poliméricas se incrementa como resultado de la formación de complejos antocianinas-taninos, así como también por la actividad de peroxidasas y polifenoxidasas, que al oxidar rápidamente las antocianinas producen un pardeamiento enzimático (Hager *et al.* 2008). Nuestros resultados muestran esa tendencia, siendo más pronunciada cuando el tratamiento se realiza con Viscozyme.

Según Pinelo, Arnous, y Meyer (2006), la presencia de actividades enzimáticas secundarias en los complejos enzimáticos puede cambiar el perfil de los compuestos fenólicos y afectar a la capacidad antioxidante de los zumos. En ese sentido, en todos los tratamientos es posible observar una disminución del contenido en fenoles totales.

Sandri, I.G. *et al.*, 2013 vieron que el zumo tratado con un extracto enzimático purificado, generalmente mostraba mayores niveles de polifenoles y actividades antioxidantes en comparación con el zumo tratado con preparaciones de enzimas comerciales, lo que concuerda con los datos obtenidos en este estudio.

Teniendo en cuenta todas estas medidas, se puede deducir que las enzimas provenientes de la cepa recombinante de *Saccharomyces bayanus* 1926-12T4PO degradan menos las propiedades antioxidantes del zumo de arándanos, de ahí que tanto los fenoles totales como las antocianinas monoméricas sean más altas que en las muestras tratadas con la enzima comercial Viscozyme.

## CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto un método de determinación de la actividad endopoligalacturonasa basado en la cuantificación a lo largo del tiempo de la cantidad de azúcares reductores generados al utilizar ácido poligalacturónico como sustrato de la acción enzimática.

La aplicación de dicho método ha permitido cuantificar la actividad endopoligalacturonasa de cuatro cepas de *Saccharomyces bayanus*, en las que el gen *PGU1* se encuentra bajo el control de distintos promotores.

La sustitución del promotor del gen de la endopoligalacturonasa (*PGU1*) por promotores de genes de la ruta de glicólisis, resulta en un aumento muy significativo de la actividad enzimática producida por las cepas recombinantes.

El promotor del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*TDH3*), ha resultado ser un promotor más fuerte, al incrementar la actividad enzimática por un factor de unas 30 veces, que el de la fosfogliceratoquinasa (*PGK1*), que solo llega a aumentar la actividad por un factor de 23 veces, a la

hora de estimular la transcripción del gen *PGU1* en el fondo genético de la cepa 1926.

El tratamiento de un homogeneizado de arándanos mediante el preparado enzimático comercial Viscozyme es más efectivo en la reducción de la viscosidad del zumo resultante que el extracto enzimático procedente de *Saccharomyces bayanus*.

En el tratamiento con enzimas pectinolíticas de un homogeneizado de arándanos, el extracto enzimático procedente de *Saccharomyces bayanus* es más eficaz en la preservación del color y de la capacidad antioxidante del zumo obtenido.

En general, las diferencias observadas tanto en las propiedades físico-químicas como en las funcionales del zumo tratado con el extracto enzimático de levadura podrían atribuirse en gran medida a las diferencias en la temperatura de trabajo.

Las cepas recombinantes de *Saccharomyces bayanus* producen un nivel de actividad pectinolítica que podría permitir su empleo en la producción industrial de un preparado enzimático.

## AGRADECIMIENTOS

A las personas que me han apoyado y han creído en mí.

## REFERENCIAS

- Arévalo-Villena, M.; Romo Sanchez, S.; Da Silva, R.; Briones Perez, A. 2011. Utilization of by-products: solid phase fermentation of pomace and skin grape for enzyme production. *Current Opinion in Biotechnology*, **22(1)**:S146-S147.
- Blanco, P.; Sieiro, C.; Diaz, A.; Villa, T. G. 1994. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, **40(11)**:974–977.
- Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T. G. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **175(1)**:1-9.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Castagnini, J.M. 2014. Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Chiralt, A.; Martínez, N.; González, C.; Talens, P.; Moraga, G. 2007. Propiedades físicas de los alimentos. Editorial UPV
- Delgado M.L.; O'Connor, J.E.; Azorín, I; Renau-Piqueras, J.; Gil, M.L.; Gozalbo, D. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology*, **147(2)**:411-417.
- Giner, J.; Ibarz, A.; Garza, S.; Xhian-Quan, S. 1996. Rheology of Clarified Cherry Juices. *Journal of Food Engineering*, **30**: 147-154.

- Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1–13.
- Hager, A.; Howard, L.; Prior, R.; Brownmiller, C. 2008. Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Black Raspberry Products. *Journal of Food Science* **(73)6**:H134–H140.
- Ibarz, A.; Gonzalez, C.; Esplugas, S., Vicente, M. 1992. Rheology of Clarified Fruit Juices. I: Peach Juices. *Journal of Food Engineering*, **15**: 49-61.
- Ibarz, A.; Gonzalez, C.; Esplugas, S. 1994. Rheology of Clarified Fruit Juices. III: Orange Juices. *Journal of Food Engineering*, **21**: 485-494.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, **40**:2931–2944.
- Jia, J.; Wheals, A. 2000. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Current Genetics*. **38**: 264-270.
- Kalt, W.; Dufour, D. 1997. Health functionality of blueberries. *HortTechnology*, **7(3)**:216–221.
- Kigsman, S.M.; Cousens, D.; Stanway, C.A.; Chambers, A.; Wilson, M., Kingsman, A.J. 1990. High-Efficiency yeast expression vectors based on the promoter of the phosphoglycerate kinase gene. *Methods in Enzymology*, **185**:329-341.
- Lee, J., R. Durst; Wrolstad, R. (2002). Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. *Journal of Food Science* **(67)5**: 1660–1667.
- Löfgren, C.; Hermansson, A. M. 2007. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. *Food Hydrocolloids*, **21(3)**: 480-486.
- Louw, C; Young, P.R.; van Rensburg, P.; & Divol, B. (2010) Regulation of endopolygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **10**: 44–57
- McIntyre, A. P.; Mukerjea, R.; Robyt, J. F. 2013. Reducing values: dinitrosalicylate gives over-oxidation and invalid results whereas copper bicinchoninate gives no over-oxidation and valid results. *Carbohydrate Research*, **380**:118-123.
- Miller, G. L. 1995. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**:426-428.
- Müller, L.; Gnoyke, S.; Popken, A.M.; Böhm, V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, **43(6)**:992-999.
- Naidu, G. S. N.; Panda, T. 2003. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, **16 (1)**:57-67.
- Penefski, H.S. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, **252**:2891–2899.
- Pinelo, M.; Zeuner, B.; Meyer, A. S. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, **88(2-3)**: 259-265.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, **22(4)**:375–83.
- Rossi, M.; Giussani, E.; Morelli, R.; Lo Scalzo, R.; Nani, R. C.; Torreggiani, D. 2003. Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, **36(9–10)**: 999–1005.
- Saccharomyces Genome Database [en línea]. Dirección URL: <<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?locus=tdh3>>-. [Consulta: 7 de Jul. 2014].
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E.J. 1993. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in Applied Microbiology*, **39**:213-294.
- Sani, D. 2013. Evolución genómica por diseño molecular de levaduras industriales. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

- Sandri, I.G.; Toscan Lorenzoni, C.M.; Claudete Fontana, R.; Moura da Silveira, M. 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT-Food Science and Technology*, **51**: 469-475.
- Seeram, N. P.; Nair, M. G. 2002. Inhibition of lipid peroxidation and structure-activity-related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(19)**: 5308–5312.
- Sieiro, C.; Poza, M.; Vilanova, M.; Villa, T. G. 2003. Heterologous Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 Gene in *Schizosaccharomyces pombe*. Yields an Enzyme with More Desirable Properties for the Food Industry. *Applied and Environmental Microbiology*, **69(3)**:1861–1865.
- Stewart, G.G. 2014. *SACCHAROMYCES* | *Saccharomyces cerevisiae*. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), Elsevier Ltd.
- Stojanovic, J.; Silva, J.L. 2007. Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, colour and chemical properties of rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, **101(3)**:898-906.
- Van Pouderoyen, G.; Snijder, H.J.; Benen, A.E.; Dijkstra, B.W. 2003. Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters*, **554(3)**: 462-466.
- Waterhouse, A. L. 2003. Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. I1.1.1-I1.1.8.
- Wood, I. P.; Elliston, A.; Ryden, P.; Bancroft, I.; Roberts, I. N.; Waldron, K. W. 2012. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, **44**:117–121.
- Wrolstad, R.E.; Acree, T.E.; Decker, E.A.; Penner, M.H.; Reid, D.S.; Schwartz, S.J.; Shoemaker, C.F.; Smith, D.; Sporns, P. 2005. Polyphenolics. *Handbook of food analytical chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- YeastGenome, 2014. *Saccharomyces* Genome Database, [On line] Dirección URL: <<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.fpl?locus=tdh3>>