

<https://doi.org/10.5154/r.ctasci.2023.03.05>

Versión en español

Efecto de pectinasas de *Aspergillus niger* en la extracción fenólica durante la maceración de uva

Daniel Jafet Valle-Ortiz^{1,2*}; Enrique Durán-Páramo¹; Luis Carlos Fernández-Linares¹; Gustavo Valencia-del Toro¹; Luis Mario Ayala-Guerrero²

Historial del artículo:

Recibido: 4 septiembre, 2024

Aceptado: 28 noviembre, 2024

*Autor de correspondencia:

djafet9205@gmail.com

¹Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Ave. Acueducto s/n, Col. Barrio La Laguna Ticomán, C. P. 07340, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. México.

²Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Ex-Hacienda San Juan Molino, Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tlaxcala C. P. 90700, México.

Resumen

La calidad sensorial de los vinos tintos se caracteriza, entre otros parámetros, por el color y el sabor que dependen de compuestos fenólicos como antocianinas y taninos. Debido a que estos compuestos son los responsables de las características sensoriales del vino, es necesario emplear técnicas que permitan extraerlos de forma eficaz y óptima. En este estudio se analiza la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos utilizando pectinasas de hongos. Se produjeron pectinasas con *Aspergillus niger* NRRL 332 en fermentación sumergida, analizando diferentes temperaturas (22, 25, 30, 35 y 38 °C), pH inicial (3.1, 3.5, 4.5, 5.5, y 6.1) y se hicieron cinéticas de crecimiento durante 120 horas. Se encontró que los puntos óptimos de producción de pectinasas fueron a una temperatura de 30 °C, pH de 5.5 y un tiempo de incubación de 72 h, con un máximo de 9.6 U · mL⁻¹. Posteriormente, las enzimas producidas se aplicaron en el proceso de maceración del vino. Con el uso de pectinasas se incrementó significativamente la concentración de fenoles solubles totales, favoreciendo atributos de color como ángulo de tono y cromaticidad.

► **Palabras clave:** Enzimas; fermentación en estado sumergido; optimización de proceso, biotecnología microbiana.

Introducción

El vino contiene compuestos fenólicos como las antocianinas y los taninos que influyen en su color, aroma y sabor, contribuyendo a la complejidad y la estabilidad del producto final. Además, tienen un impacto significativo en su valor comercial, ya que son determinantes en la calidad sensorial del vino y se utilizan como marcadores de autenticidad en la industria vinícola (Gutiérrez-Escobar et al., 2021). Estos metabolitos secundarios se localizan principalmente en la vacuola, y su liberación depende de la ruptura de la pared celular durante la etapa de maceración (Gao et al., 2016). Su concentración y perfil pueden ser modulados durante el proceso de producción para obtener características deseadas que aporten singularidad al vino (Gutiérrez-Escobar et al., 2021; Merkyte et al., 2020). La extracción de compuestos

fenólicos en las uvas se ha probado con sonicación (Osete-Alcaraz et al., 2019), aplicación de microondas (Caldas et al., 2018; Wang et al., 2019) y la incorporación de enzimas (Gao et al., 2019).

En esta última alternativa, se ha demostrado que el uso de pectinasas puede ayudar a romper las cadenas poliméricas que conforman la pared celular y favorecer la liberación de los metabolitos secundarios (Satapathy et al., 2020). Durante la etapa de maceración, estas enzimas optimizan la extracción de antocianinas, taninos y otros compuestos fenólicos (Fernández-González et al., 2024). Las pectinasas se encuentran de forma natural en las plantas; sin embargo, la producción industrial se realiza principalmente con sistemas microbianos, entre los que se encuentra un gran número de cepas bacterianas como *Bacillus* spp. (Mercimek Takcı &

Turkmen, 2016), algunas levaduras como *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Bilal et al., 2022; Poondla et al., 2016) y muchos hongos filamentosos, principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Li et al., 2015). *Aspergillus niger* es el microorganismo más utilizado en este campo biotecnológico, ya que ha sido reconocido generalmente como seguro (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) del gobierno de los Estados Unidos (Reginatto et al., 2017). La producción de pectinasas se ha llevado a cabo mediante fermentación en estado sólido (SsF) (Pitol et al., 2016; Poletto et al., 2017) y fermentación sumergida (SmF) (Fratesbianchi et al., 2017; Silva et al., 2019). En esta última, el microorganismo crece en un medio líquido y se caracteriza por ser un proceso con condiciones fisicoquímicas controladas y asépticas, con nutrientes disueltos homogéneamente y siempre disponibles en el medio de cultivo (Ravindran & Jaiswal, 2016). El control de este bioproceso depende de diversos factores, donde destacan el pH y la temperatura (Amin et al., 2019), los cuales deben ser evaluados para definir las mejores condiciones en el proceso de producción de la enzima.

En este contexto, el objetivo del trabajo fue caracterizar las condiciones de producción de pectinasas a través de cultivos sumergidos con *A. niger* y aplicarlas durante el proceso de maceración del vino para evaluar su efecto en la extracción de compuestos fenólicos.

Materiales y métodos

Preparación del inóculo y de los cultivos sumergidos

Se utilizó la cepa *Aspergillus niger* NRRL 332, proporcionada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, la cual fue propagada en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, marca BD Bioxon) e incubada a 30 °C durante 5 días. Posteriormente, se realizó un raspado de esporas y se resuspendieron en una solución al 0.05 % v/v de Tween 20 para cuantificarlas con una cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones hasta alcanzar una concentración de 1×10^5 esporas \cdot mL⁻¹ (Reginatto et al., 2017).

Producción de pectinasas

Se utilizaron matraces Erlenmeyer con 50 mL de caldo de cultivo compuesto de extracto de levadura al 1.0 % (grado analítico, Meyer), MgSO₄ al 0.48 % (grado analítico, Meyer), FeSO₄ al 0.018 % (grado analítico, Meyer), CaCl₂ al 0.0075 % (grado analítico, Meyer), KH₂PO₄ al 0.02 % (grado analítico, Fermont), (NH₄)₂SO₄ al 0.0125 % (grado analítico, Fermont) y pectina cítrica pura grado reactivo al 1.0 % (grado analítico, Fermont) y se inocularon con la solución de esporas preparada previamente. Los tratamientos se incubaron con agitación constante a 200 rpm durante 72 h (Reginatto et al., 2017). La producción de pectinasas se evaluó con un diseño experimental de super-

ficie de respuesta central compuesto (Cuadro 1) con dos factores, pH inicial (3.1, 3.5, 4.5, 5.5 y 6.1) y temperatura (22, 25, 30, 35 y 38 °C), cada uno con dos niveles (+1 y -1), dos puntos axiales (+1.5 y -1.5) y un punto central (0), resultando en un total de nueve tratamientos con sus respectivas réplicas (cinco réplicas para el punto central y tres para los puntos axiales y niveles), con el software Matlab 2013. La variable respuesta fue la actividad enzimática de los caldos de cultivo expresada en U \cdot mL⁻¹. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para producir un micromol de ácido galacturónico por minuto en las condiciones de ensayo. El diseño Central Compuesto se basó en la siguiente ecuación polinómica de segundo orden (1):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

Donde: Y es la actividad de pectinasa predicha (U \cdot mL⁻¹), X_i y X_j son los parámetros Temperatura (°C) y pH), β_0 es el término de intersección, y β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes lineales, cuadráticos y de interacción, respectivamente. Las respuestas predichas obtenidas a partir del diseño Central Compuesto se compararon con las respuestas reales para estimar la precisión de esta metodología.

A partir de las condiciones que generaron la mayor actividad de pectinasas fueron realizadas cinéticas de producción de biomasa por triplicado, actividad enzimática, consumo de sustrato y variación del pH, midiendo cada parámetro en intervalos de 12 h durante cinco días.

La producción de biomasa se determinó mediante el método de peso seco descrito por Reginatto et al. (2017) separando los pellets formados de la fase líquida con papel filtro Whatman No. 1 y secándolos a 80 °C durante 24 h, los resultados se expresaron en g \cdot L⁻¹. El consumo de sustrato se cuantificó mediante el método de antrona descrito por Sim et al. (1997); la absorbancia de la muestra se midió en un espectrofotómetro (GENESYS™ 10, Thermo Scientific™, USA) a 650 nm y los resultados se expresaron en g \cdot L⁻¹. Para determinar la actividad enzimática, el caldo de cultivo se sometió a microfiltración para concentrar la enzima utilizando una celda Amicon® de 50 mL y una membrana de celulosa de 10 kDa, a una presión de 40 psi y 180 rpm. La fracción retenida se recuperó con resuspensión en 10 mL de buffer acetato 0.1 M y pH 4.5, adicionando 1 % (p/v) de pectina cítrica como sustrato; posteriormente, se midió la concentración de ácido galacturónico liberado con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959). Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro (GENESYS™ 10, Thermo Scientific™, USA) a 540 nm y los resultados se expresaron en U \cdot mL⁻¹. Con el mismo concentrado enzimático, se midió el contenido de proteína mediante la técnica de Bradford (1976), utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar. Los resultados se expresaron en mg \cdot L⁻¹.

Cuadro 1. Diseño experimental Central Compuesto para producción de pectinasas por *A. niger* NRRL 332.

Tratamiento	Combinación de puntos codificados	Temperatura	pH
1	0, 0	30	4.5
2	-1, -1	25	3.5
3	+1, -1	35	3.5
4	-1, +1	25	5.5
5	+1, +1	35	5.5
6	-1.5, 0	22	4.5
7	+1.5, 0	38	4.5
8	0, -1.5	30	3.1
9	0, +1.5	30	6.1

Electroforesis por SDS-PAGE

El peso molecular de las pectinasas producidas se estimó mediante SDS-PAGE siguiendo el método de (Laemmli, 1970) con algunas modificaciones, utilizando un gel separador y un gel concentrador. El gel separador se preparó con 2.5 mL de solución de Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8, marca Sigma Aldrich), 4.82 mL de agua destilada, 5 mL de acrilamida (marca Sigma Aldrich), 0.125 mL de SDS al 10 % (marca BioRad), 0.06 mL de PSA (BioRad) y 17.5 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetrametilendiamina, grado analítico, BioRad). El gel concentrador se elaboró con 0.15 mL de solución de Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (grado analítico, Sigma Aldrich), 3.78 mL de agua destilada, 0.75 mL de acrilamida (grado analítico, Sigma Aldrich), 0.1 mL de SDS al 10 % (grado analítico, BioRad), 0.025 mL de PSA al 10 % (grado analítico, BioRad) y 7 µL de TEMED (grado analítico, BioRad). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Mini Protean® Tetra Cell (BioRad, EE. UU.) a 180 V durante 45 minutos. La tinción de las proteínas se realizó con Azul Brillante de Coomassie R-250 (grado analítico, BioRad). Las resoluciones proteicas obtenidas se analizaron con un escáner de cromatogramas de longitud de onda dual (Shimadzu, CS-910, Japón) y la adquisición de datos se realizó utilizando el software Chromatography Station CSW de DataApex Ltd.

Aplicación del extracto enzimático en el proceso de maceración del vino

Se utilizaron 1200 g de frutos de uva (*Vitis vinifera*) variedad *Carignan*, cosechados en Ensenada, Baja California, México, que presentaron contenido de sólidos solubles totales de 29 °Brix. Los frutos se dividieron en tres grupos de 100 g cada uno, que se molieron en mortero y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El material del primer grupo se colocó a 25 °C, se tomó como control positivo (CP) y representó la concentración inicial de compuestos fenólicos. El segundo grupo constituyó el control negativo (CN) y se formó con macerado de uva a 40 °C. El tercer grupo (E) consistió en macerado de uva adicionado

con 3 mL del concentrado enzimático con una actividad hidrolítica de 4.66 U · mg⁻¹ y sometido a temperatura de 40 °C. Todos los tratamientos estuvieron en agitación constante a 200 rpm durante 30 min. Se cuantificó el perfil fitoquímico de los macerados de uva utilizando curvas de calibración con estándares. La concentración de fenoles totales (TP) se determinó según el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). La absorbancia se midió a 760 nm. Se utilizó ácido gálico como estándar (grado analítico, Sigma Aldrich) y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (GAE · mL⁻¹). Los flavonoides totales (Fl) se cuantificaron de acuerdo con el método de cloruro de aluminio con quercetina (meq · mL⁻¹, grado analítico, Sigma Aldrich) a 510 nm (Zhishen et al., 1999). Los taninos condensados (TC) se midieron con el método de vainillina utilizando catequina como estándar (meq · C · mL⁻¹, grado analítico, Sigma Aldrich) a 550 nm (Price et al., 1978). La concentración de antocianinas se cuantificó con el método diferencial de pH para determinar el contenido de antocianina monomérica total (Ant) de las muestras (Lee et al., 2005) con cianidina-3-glucósido · mL⁻¹ (C3G · mL⁻¹, grado analítico, Sigma Aldrich). La absorbancia de las muestras diluidas con soluciones tampón de cloruro de potasio (pH 1.0) y acetato de sodio (pH 4.5) se midió mediante un espectrofotómetro a longitudes de onda de 520 y 700 nm. Los valores de absorbancia se calcularon de acuerdo con la ecuación (2):

$$A = (A_{520} - A_{700})pH_{1.0} - (A_{520} - A_{700})pH_{4.5} \quad (2)$$

Por último, se evaluó el color con un colorímetro Hunter Lab (Mini Scan XE Plus 45/0-L, EUA) y se expresó como luminosidad, ángulo de matiz y cromaticidad (Carvajal-Herrera et al., 2011).

Esta fase se realizó con un diseño completamente al azar, donde los tratamientos CP, CN y E constituyeron la fuente de variación. Se aplicó un análisis de varianza complementado con pruebas de comparación de medias de tratamiento realizadas con el estadístico de Tukey, con nivel de significancia de 0.05.

Cuadro 2. Ajuste del modelo a los datos experimentales de producción de pectinasas por *Aspergillus niger* NRRL 332.

Temperatura (°C)	pH	Y experimental (U·mL ⁻¹)	Y predictivo (U·mL ⁻¹)	Error (%)
22	4.5	4.1093	5.1810	26.0792
25	3.5	8.3822	6.4436	23.1282
25	5.5	9.5884	7.5204	21.5678
30	4.5	8.0292	8.6754	8.0475
30	2.9	5.6354	6.1352	8.8690
30	6.1	8.2866	8.9428	7.9188
35	3.5	4.5175	5.1496	13.9924
35	5.5	7.0805	7.5824	7.0881
38	4.5	5.2125	4.1954	19.5127
			Promedio:	15.1337

Resultados y discusión

Aspergillus niger NRRL 332 mostró la mayor producción de pectinasas a una temperatura (T°) de 25 y 30 °C y un pH que varió de 5.0 a 5.8 con un rango de variación entre 8.91 y 9.09 U·mL⁻¹ (Figura 1), sin diferencias significativas entre estos niveles. El modelo utilizado (Ecuación 1) en la superficie de respuesta, se ajustó en 84.8 % a los datos experimentales (Cuadro 2), expresado en la Ecuación 3.

$$Y = -49.3309 + 3.3713*A + 2.8385*B + 0.0678*A*B - 0.0623*A^2 - 0.4439*B^2 \quad (3)$$

Al realizar un análisis de varianza ($P \leq 0.05$), se corroboró que, tanto la temperatura como el pH influyeron significativamente sobre la producción de pectinasas (Cuadro 3). Diversos estudios han investigado las condiciones óptimas para la producción de pectinasas por *Aspergillus niger*. Por ejemplo, El Enshasy et al. (2018) evaluaron el efecto del pH inicial sobre la producción de pectinasas de la cepa NRC1ami, encontrando que un pH de 5.5 era óptimo para la producción de pectinasa en cultivo sumergido. Por otro lado, (Sandri & da Silveira, 2018) estudiaron la producción de pectinasas de *Aspergillus niger* LB-02-SF en cultivo en estado sólido, utilizando un pH de 4.0 y una temperatura de 30 °C, obteniendo una actividad enzimática máxima de 68 U·g⁻¹. Estos estudios indican que, aunque las condiciones óptimas pueden variar según la cepa y el método de

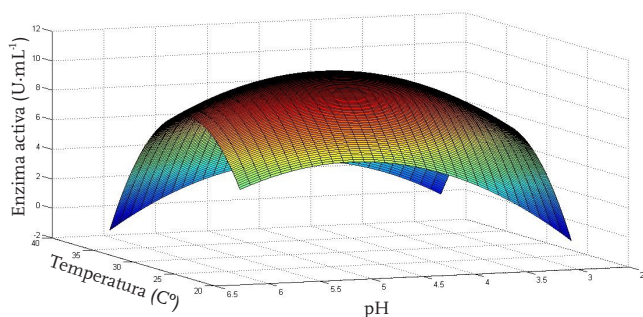


Figura 1. Superficie de respuesta de la interacción de la temperatura y pH sobre la producción de pectinasas de *A. niger* NRRL 332.

cultivo, un pH en el rango de 4.0 a 5.5 y una temperatura de 30 °C son comunes para la producción eficiente de pectinasas por *Aspergillus niger*.

Cinéticas de crecimiento y producción de pectinasas

En la Figura 2 se muestra que la cepa produjo un máximo de 9.1 U·mL⁻¹ a las 72 h de incubación. Asimismo, se observa que la mayor producción de biomasa ocurrió a las 65 h. Por tanto, se infiere que la producción de pectinasas

Cuadro 3. Análisis de varianza del efecto de la temperatura y el pH sobre la producción de pectinasas de *A. niger* NRRL 332.

Fuente	SC	GL	CM	Estadístico F	Valor P
Regresión	57.78	5	11.55	7.14	0.001
A	15.48	1	15.48	9.57	0.005
B	0.85	1	0.85	0.53	0.476
A*A	23.48	1	23.48	14.52	0.001
B*B	2.53	1	2.53	1.57	0.224
A*B	1.38	1	1.38	0.85	0.366
Error	33.97	22	0.27		

R²=0.95; Coeficiente de Variación= 8.4249; A= Temperatura; B= pH.

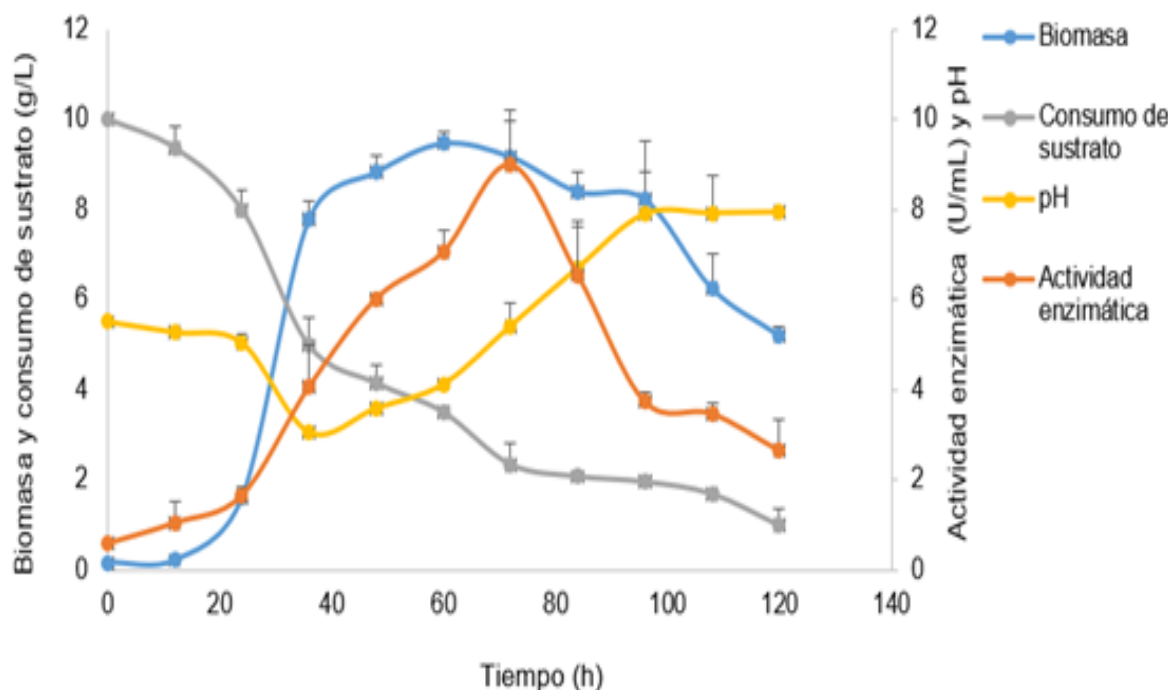


Figura 2. Cinéticas de crecimiento y producción de pectinasas por *A. niger* NRRL 332.

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de *A. niger* NRRL 332.

μ_{max} (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g de biomasa-g de sustrato $^{-1}$)	$Y_{p/s}$ (U-g de sustrato $^{-1}$)
0.0769	1.52	1.12

estuvo relacionada directamente con el crecimiento del microorganismo. Además, se muestra que la producción de enzimas aumentó conforme se consumió el sustrato (pectina cítrica pura), se encontró que por cada gramo de pectina consumida se produjeron 1.12 unidades de actividad enzimática (Cuadro 4). Algunos estudios han indicado que la producción de pectinasas en *Aspergillus niger* está regulada por la expresión del gen *pg1*, el cual es inducido en presencia de pectina en el medio de cultivo, resultando en una mayor producción de pectinasas (Lin et al., 2021).

Asimismo, se observa una disminución inicial del pH en las primeras 24 horas, seguida por un incremento después de 60 horas de incubación. Este comportamiento ha sido atribuido a la producción de compuestos ácidos como el ácido cítrico y el ácido glucónico, que son productos conocidos del metabolismo de *A. niger* (Shrestha et al., 2021). Además, esta especie es capaz de sintetizar otras enzimas hidrolíticas importantes, tales como fitasas y amilasas, lo que refuerza su relevancia en procesos biotecnológicos (Sahu & Sevda, 2022).

Caracterización por SDS-PAGE

Los resultados del zimograma presentado por el método de electroforesis SDS-Page mostraron dos bandas con pesos moleculares de 45 y 70 kDa (Figura 3), lo que indicó que

probablemente eran los pesos de las pectinasas producidas por el microorganismo en estudio. De acuerdo con (Okonji et al., 2019), el peso molecular de las pectinasas varía de 30 a 70 kDa. Los resultados obtenidos son consistentes

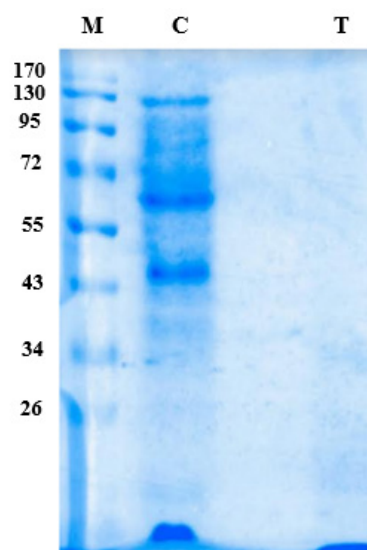


Figura 3. Electroforesis en SDS page de pectinasas producidas por *A. niger* NRRL 332. M: Marcador de peso molecular (kDa). C: Bandas correspondientes a pectinasas. T: Tratamiento control (caldo de cultivo sin pectinasas).

con estudios que han caracterizado poligalacturonasas con pesos moleculares similares. Por ejemplo, (Nawaz et al., 2021) purificaron una poligalacturonasa de *Penicillium notatum* con un peso molecular de 38 kDa. La evaluación de la actividad enzimática se apoyó en el método DNS, basado en la determinación de grupos carbonilos libres (C=O) de los azúcares reductores, que se producen cuando la cadena de pectina es hidrolizada por la pectinasa. Estos se presentan cuando la cadena de pectina es hidrolizada por la pectinasa, por lo que se aceptó que entre las enzimas pécticas producidas se encontraba una poligalacturonasa.

Aplicación del extracto enzimático en el proceso de maceración del vino

Con el uso de pectinasas en la maceración de frutos de uva, las concentraciones de fenoles solubles totales, flavonoides, antocianinas y taninos condensables aumentaron en 90, 44, 104 y 43 % respectivamente, con respecto al control positivo (Cuadro 5). El uso de pectinasas durante la maceración de uvas y otros frutos se ha estudiado ampliamente debido a su capacidad para descomponer la pared celular y facilitar la liberación de compuestos fenólicos y otros metabolitos beneficiosos. De acuerdo con (Guler, 2023) las técnicas de maceración que incluyen la combinación de tratamientos enzimáticos y de calor no solo aumentan la extracción de antocianinas y flavonoides, sino que también mejoran la capacidad antioxidante del producto final. Este estudio mostró que el tratamiento con microondas combinado con pectinasas incrementó el contenido de catequina y trans-resveratrol, compuestos clave para la actividad antioxidante de los jugos de uva. Esto evidencia que la sinergia entre tratamientos térmicos y enzimáticos puede potenciar la liberación de compuestos fenólicos desde la piel y semillas de las uvas. De manera similar, (Osete-Alcaraz et al., 2022) discutieron la importancia del uso de pectinasas no solo para aumentar la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración, sino también para mejorar la claridad y la estabilidad del vino. Su investigación demostró que el uso de pectinasas

puede reducir el material suspendido en el mosto, facilitando la sedimentación y promoviendo un producto final más claro y con mejores características cromáticas. Estos hallazgos subrayan cómo la optimización de los procesos enzimáticos puede influir en la composición fenólica y la calidad visual del vino. Por otro lado, (Ngadze et al., 2018) analizaron el impacto de la combinación de tratamiento enzimático y calor en la extracción de compuestos fenólicos en *Strychnos cocculoides*, encontrando un incremento en el rendimiento del jugo y en la concentración de compuestos como la quercetina y el ácido cafeico. La combinación de pectinasas y calor favoreció la descomposición de la pectina, lo que no solo mejoró la extracción de los compuestos fenólicos sino también la calidad fisicoquímica y la claridad del jugo. Esto apoya la idea de que las condiciones de tratamiento térmico y la selección de enzimas específicas son determinantes para maximizar el aprovechamiento de los componentes bioactivos de las frutas.

Por otra parte, el tipo de tratamiento empleado en la maceración de los frutos de uva no provocó un efecto significativo sobre la luminosidad, pero sí sobre el ángulo de tono y la cromaticidad (Cuadro 5), lo que indica que el aspecto del extracto obtenido fue diferente en color y, por tanto, se espera que el vino obtenido tenga un aspecto diferente. Entre las características que definen la calidad de un vino, el color es un factor determinante y, al respecto, los atributos sensoriales son los primeros que se observan en la cata. A través del color, en sus aspectos de intensidad y tonalidad, se recibe información sobre los posibles defectos y virtudes, la estructura, la edad y la evolución en el vino (Acosta et al., 2013). Por ello, el color del extracto de maceración se caracterizó mediante los parámetros clásicos de luminosidad, cromaticidad y ángulo de tono. La luminosidad representa si un color es oscuro, gris o claro, variando desde cero para el negro hasta 100 para el blanco (Carvajal-Herrera et al., 2011). Los valores de luminosidad (L^*) obtenidos en los extractos procesados con los tratamientos CP, CN, y E fueron 6.1, 6.3, y 6.4 respectivamente, no existiendo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos.

Cuadro 5. Comparación de medias de la extracción de compuestos fenólicos.

Trat	Variables respuesta						
	TP (GAE·mL ⁻¹)	Fl (meq-Q·mL ⁻¹)	Ant (C3G·mL ⁻¹)	TC (meq-C·mL ⁻¹)	L*	H* (°H)	C*
CP	234.2 ± 17.9 ^b	95.1 ± 3.5 ^b	49.9 ± 11.1 ^b	310.5 ± 36.3 ^b	6.1 ± 1.3 ^a	305.9 ± 9.9 ^b	5.2 ± 1.2 ^b
CN	248.2 ± 8.9 ^b	97.7 ± 8.4 ^b	67.1 ± 3.3 ^b	315.1 ± 46.3 ^b	6.3 ± 0.9 ^a	310.5 ± 12.4 ^b	5.2 ± 0.5 ^b
E	447.2 ± 31.3 ^a	137.7 ± 15.0 ^a	102 ± 11.2 ^a	445.9 ± 42.9 ^a	6.4 ± 1.41 ^a	347.8 ± 3.8 ^a	6.4 ± 0.6 ^a

Trat: tratamientos PC: control positivo; CN: control negativo; E: tratamiento con enzima. Variables respuesta. TP: fenoles solubles totales; Fl: flavonoides totales; Ant: antocianinas totales; TC: Taninos Condensados; L*: luminosidad; H*: ángulo de tono; C*: cromaticidad. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$); GAE·mL⁻¹: mg equivalentes de ácido gálico·mL⁻¹; meq-Q·mL⁻¹: mg equivalentes de quercetina; C3G·mL⁻¹: mg equivalentes de cianidina-3-glucósido·mL⁻¹; meq-C·mL⁻¹: mg equivalentes de catequina.

El ángulo de tono (H^*) representó el color del producto obtenido de la maceración y se ha asumido que representaría la tonalidad que tendría el vino elaborado a partir de éste. El control positivo (CP) presentó una tonalidad de 305.9° , es decir el color púrpura característico de la fruta de la uva. Con el tratamiento CN el ángulo aumentó a 310.5° , equivalente a un tono púrpura más intenso que el anterior; mientras que con la aplicación pectinasas se logró aumentar 347.8° , referentes a una tonalidad rojiza característica de los pigmentos de compuestos fenólicos como las antocianinas. La cromaticidad representa la pureza del color e indica qué tan pálido o intenso es el tono. El tratamiento E produjo el valor de cromaticidad más alto con 6.4, mientras que, los tratamientos CN y CP ambos con 5.2, sin diferencias entre ninguno de ellos ($P > 0.05$). Aunque la luminosidad no se vio afectada significativamente entre los tratamientos, la aplicación de enzimas mostró un aumento en el ángulo de tono del extracto de maceración, ya que este atributo fue más parecido a un valor absoluto de rojo y los valores de cromaticidad más altos indicaron que dicho tono se mostró con mayor intensidad.

La tonalidad y el color de los vinos son aspectos fundamentales en la percepción de su calidad y atractivo. En vinos tintos jóvenes, se valoran tonalidades púrpura y rojo-violáceo, indicativas de frescura y riqueza en antocianinas, los principales pigmentos presentes en las uvas (He et al., 2010). Con la maduración, se busca un rojo más intenso y brillante, asociado a una mayor complejidad y estructura. La transición hacia tonos más anaranjados o marrones es típica de vinos envejecidos y, aunque puede indicar madurez, también se asocia con la pérdida de frescura y vitalidad (Waterhouse et al., 2016).

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel crucial en la copigmentación del vino. Este fenómeno ocurre cuando las antocianinas interactúan con otros fenoles, formando complejos estables que intensifican y estabilizan el color (Boulton, 2001). La copigmentación contribuye a los tonos rojo-violáceos profundos, especialmente deseables en vinos tintos jóvenes. Además, la presencia de antocianinas y compuestos flavonoides en la matriz del vino influye en la percepción visual, realzando la cromaticidad y pureza del color (He et al., 2010).

Con el paso del tiempo, el color de los vinos cambia debido a reacciones de polimerización y oxidación. Las antocianinas libres disminuyen y se combinan con taninos y otros compuestos, formando complejos más grandes y menos solubles que conducen a tonalidades más anaranjadas y marrones. Esta transición se asocia con la oxidación de los compuestos fenólicos y la pérdida de las propiedades de copigmentación (Ribéreau-Gayon P. et al., 2006). La aplicación de enzimas, como las pectinasas, ha mostrado favorecer la liberación de antocianinas y otros fenoles, contribuyendo inicialmente a una mayor intensidad de color, pero también puede influir en la estabilidad a largo

plazo del color debido a cambios en la estructura de los pigmentos (Morata et al., 2003).

En este contexto, la discusión de los resultados sugiere que la aplicación de pectinasas, al aumentar el ángulo de tono y la cromaticidad, realza la tonalidad rojiza, probablemente por la liberación y modulación de antocianinas y otros compuestos fenólicos. Este comportamiento es consistente con lo reportado en estudios que destacan cómo las enzimas pueden intensificar la percepción del color a través de la descomposición de las paredes celulares de las uvas y la liberación de pigmentos (Morata et al., 2003). Por lo tanto, el uso de enzimas no solo mejora la extracción de compuestos fenólicos, sino que también tiene implicaciones significativas en la estabilidad y evolución del color durante el almacenamiento.

Conclusiones

El uso de pectinasas producidas por *Aspergillus niger* en el proceso de maceración de frutos de uva favoreció la liberación de compuestos fenólicos. Como resultado, se incrementaron los atributos de color, específicamente el ángulo de tono y la cromaticidad, lo que podría favorecer la producción de vinos con características sensoriales superiores.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) de México.

Referencias

- Acosta, Y., Etxabe, R., Fábrega, J., García A., Murcia, J. L., Nebot, J., Tolosa, L., & Urrero, G. (2013). El libro del vino (J. Induráin, Ed.; Primera, Vol. 1). LAROUSSE EDITORIAL, S. L.
- Amin, F., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 122, pp. 1017–1026). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
- Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. N., & Cheng, H. (2022). Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.851768>
- Boulton, R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. In *Am. J. Enol. Vitic* (Vol. 52, Issue 2).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microorganism quantities of protein, using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., Borguini, R. G.,

- Godoy, R. L. O., Cabral, L. M. C., & Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>
- Carvajal-Herrera, C., Jaime, J., Torres, A., Darío, I., Tascón, O., Eugenio, C., Montoya, M., & Wilson, J. (2011). Colorimetría del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(2), 6229–6240. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922664020>
- El Enshasy, H. A., Elsayed, E. A., Suhaimi, N., Malek, R. A., & Esawy, M. (2018). Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. *BMC Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0481-7>
- Fernández-González, M., Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Paniagua-Martínez, T., & Gómez-Alonso, S. (2024). The Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overexpressing the Endopolygalacturonase PGU1 Gene on the Aminoacidic, Volatile, and Phenolic Compositions of Cabernet Sauvignon Wines. *Fermentation*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/fermentation10070375>
- Fratebianchi, D., Crespo, J. M., Tari, C., & Cavalitto, S. (2017). Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(2), 305–310. <https://doi.org/10.1002/jctb.5006>
- Gao, Y., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2016). Dissecting the polysaccharide-rich grape cell wall matrix using recombinant pectinases during winemaking. *Carbohydrate Polymers*, 152, 510–519. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.115>
- Gao, Y., Zietsman, A. J. J., Vivier, M. A., & Moore, J. P. (2019). Deconstructing wine grape cell walls with enzymes during winemaking: New insights from glycan microarray technology. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24010165>
- Guler, A. (2023). Effects of different maceration techniques on the colour, polyphenols and antioxidant capacity of grape juice. *Food Chemistry*, 404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134603>
- Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: A review. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>
- He, F., Mu, L., Yan, G. L., Liang, N. N., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 12, pp. 9057–9091). <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lee, J., Durst, R. W., Wrolstad, R. E., Barnes, K. W., Eisele, J., Giusti, M. M., Haché, J., Hofsommer, H., Koswig, S., Krueger, D. A., Kupina, S., Martin, S. K., Martinsen, B. K., Miller, T. C., Paquette, F., Ryabkova, A., Skrede, G., Trenn, U., & Wightman, J. D. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Li, P. J., Xia, J. L., Shan, Y., Nie, Z. Y., Su, D. L., Gao, Q. R., Zhang, C., & Ma, Y. L. (2015). Optimizing Production of Pectinase from Orange Peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 Using Response Surface Methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 6(1), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9317-4>
- Lin, W., Xu, X., Lv, R., Huang, W., Ul Haq, H., Gao, Y., Ren, H., Lan, C., & Tian, B. (2021). Differential proteomics reveals main determinants for the improved pectinase activity in UV-mutagenized *Aspergillus niger* strain. *Biotechnology Letters*, 43(4), 909–918. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03075-w>
- Mercimek Takcı, H. A., & Turkmen, F. U. (2016). Extracellular Pectinase Production and Purification from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *International Journal of Food Properties*, 19(11), 2443–2450. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1123270>
- Merkyte, V., Longo, E., Windisch, G., & Boselli, E. (2020). Phenolic compounds as markers of wine quality and authenticity. In *Foods* (Vol. 9, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods9121785>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7402–7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>
- Nawaz, A., Sameer, M., Akram, F., Tahir, S. F., Arshad, Y., Haq, I. U., & Mukhtar, H. (2021). Kinetic and thermodynamic insight of a polygalacturonase: A biocatalyst for industrial fruit juice clarification. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(2), 1029–1045. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2355>
- Ngadze, R. T., Verkerk, R., Nyanga, L. K., Fogliano, V., Ferracane, R., Troise, A. D., & Linnemann, A. R. (2018). Effect of heat and pectinase maceration on phenolic compounds and physicochemical quality of *Strychnos coccoloides* juice. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202415>
- Okonji, R. E., Itakorode, B. O., Ovumedia, J. O., & Adedeji, O. S. (2019). Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70301>
- Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A. E., & Gómez-Plaza, E. (2019). Combined Use of Pectolytic

- Enzymes and Ultrasounds for Improving the Extraction of Phenolic Compounds During Vinification. *Food and Bioprocess Technology*, 12(8), 1330–1339. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02303-0>
- Osete-Alcaraz, A., Gómez-Plaza, E., Pérez-Porras, P., & Bautista-Ortín, A. B. (2022). Revisiting the use of pectinases in enology: A role beyond facilitating phenolic grape extraction. *Food Chemistry*, 372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131282>
- Pitol, L. O., Biz, A., Mallmann, E., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2016). Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 283, 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.08.046>
- Poletto, P., Polidoro, T. A., Zeni, M., & da Silveira, M. M. (2017). Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. *LWT*, 79, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.018>
- Poondla, V., Yannam, S. K., Gummadi, S. N., Subramanyam, R., & Reddy Obulam, V. S. (2016). Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.007>
- Price, M. L., Scoyoc, S. Van, & Butler, L. G. (1978). A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. In *J. Agric. Food Chem* (Vol. 26, Issue 5).
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. In *Bioengineering* (Vol. 3, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/bioengineering3040030>
- Reginatto, C., Rossi, C., Miglioranza, B. G., Santos, M. dos, Meneghel, L., Silveira, M. M. da, & Malvessi, E. (2017). Pectinase production by *Aspergillus niger* LB-02-SF is influenced by the culture medium composition and the addition of the enzyme inducer after biomass growth. *Process Biochemistry*, 58, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.018>
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., & Rychlewski Christine. (2006). *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2 nd Edition* (Second). John Wiley & Sons Ltd.
- Sahu, R., & Sevda, S. (2022). Pectinases: Production, Harvest, Recovery, and Potential Industrial Application. In *Industrial Microbiology and Biotechnology* (pp. 257–277). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-16-5214-1_10
- Sandri, I. G., & da Silveira, M. M. (2018). Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- Satapathy, S., Rout, J. R., Kerry, R. G., Thatoi, H., & Sahoo, S. L. (2020). Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00117>
- Shrestha, S., Rahman, M. S., & Qin, W. (2021). New insights in pectinase production development and industrial applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 105, Issue 24, pp. 9069–9087). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- Silva, J. de C., de França, P. R. L., de Melo, A. H. F., Neves-Petersen, M. T., Converti, A., & Souza Porto, T. (2019). Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, 79, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.014>
- Sim, L., Ward, O. P., & Li, Z.-Y. (1997). Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. In *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (Vol. 19). <https://academic.oup.com/jimb/article/19/4/232/5991500>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Wang, J., Zhang, Y., Wang, H., & Huo, S. (2019). Evaluation of extraction technologies and optimization of microwave and ultrasonic assisted consecutive extraction of phenolic antioxidants from winery byproducts. *Journal of Food Process Engineering*, 42(4). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13064>
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry* (Second). Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559.