



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES
FORMULADOS A BASE DE LEVADURAS SECAS INACTIVAS DE
USO ENOLÓGICO**

CELESTE NATALIA DUARTE VENEGAS

**SANTIAGO-CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES FORMULADOS
A BASE DE LEVADURAS SECAS INACTIVAS DE USO ENOLÓGICO**

**CHARACTERIZATION OF COMMERCIAL PRODUCTS FORMULATED
BASED ON INACTIVE DRY YEAST OF OENOLOGICAL USE**

CELESTE NATALIA DUARTE VENEGAS

SANTIAGO-CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES FORMULADOS
A BASE DE LEVADURAS SECAS INACTIVAS DE USO ENOLÓGICO**

Memoria para optar al título profesional de:

Ingeniera Agrónoma

CELESTE NATALIA DUARTE VENEGAS

Profesores Guías	Calificaciones
Sr. Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,8
Sr. Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	6,5
Profesores Evaluadores	
Sr. Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,8
Sr. Nelson Díaz Pérez Profesor de Estado en Biología y Ciencias, Dr.	6,0

SANTIAGO-CHILE

2013

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este proyecto.

A mis profesores guías, Elías Obreque y Remigio López, por su buena disposición, orientación, apoyo y sobre todo por la paciencia que tuvieron durante todo el proceso.

Especialmente doy gracias a mi familia, mi fiel compañera Tania y amigos, por el apoyo y confianza incondicional que me han entregado siempre.

Mi reconocimiento y agradecimiento a los proyectos U-Inicia 11/05 y Fondecyt 11121322 por entregarme las herramientas y materiales necesarios para la realización de éste proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras claves	1
ABSTRACT	2
Key words	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivos	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Lugar de trabajo	5
Materiales	5
-Productos comerciales a base de levaduras secas inactivas	5
-Reactivos, materiales y equipamiento	5
Metodologías	6
-Tratamientos y Diseño Experimental	6
-Procedimiento	6
VARIABLES A MEDIR	6
-Ensayos de solubilidad	6
-Medición de absorbancia a 280 nm	7
-Contenido de proteínas	7
-Contenido de polisacáridos	7
-Fraccionamiento electroforético de los productos comerciales	7
Análisis estadístico	8
RESULTADOS	9
Ensayos de detección de proteínas sobre membranas de celulosa	9
-Ensayo de difusión	9
-Ensayo de precipitación	10
Ensayos de detección de proteínas sobre membranas de celulosa (Solución hidroalcohólica)	11
-Ensayo de difusión	11
-Ensayo de precipitación	11
Caracterización física y química de las muestras de levaduras	12
Electroforesis	13
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

En los últimos años, la elaboración del vino ha experimentado notables avances tecnológicos que han permitido mejorar su calidad y diversificar la oferta de los mismos. Así, el uso de nuevos insumos enológicos, tales como aquellos formulados a base de levaduras secas inactivas, han experimentado una alta demanda. Estos productos se utilizan como potenciadores de la fermentación alcohólica y maloláctica. Además, se han asociado con importantes características organolépticas en los vinos. A pesar de la relevancia de estos insumos, existe limitada información acerca de su composición.

El siguiente estudio comparó 10 productos en base de levaduras secas inactivas mediante parámetros químicos y físicos, tales como, medición de absorbancia a 280 nm, ensayos de detección de proteínas sobre membranas de celulosa, contenido de proteínas, contenido de polisacáridos y fraccionamiento electroforético.

Según los resultados obtenidos en este estudio, los productos comerciales a base de levaduras poseen propiedades físicas y químicas diferenciales. Se destacan los productos PC₁, PC₂ y PC₃, los cuales mostraron una alta afinidad con el colorante Coomassie Blue R-250 y presentaron un contenido significativamente mayores de proteínas en comparación al resto de los productos. En cuanto a la composición de polisacáridos fue altamente variable entre los distintos productos comerciales. Por otra parte el material proteico detectable por Coomassie Blue en geles de poliacrilamida corresponde a material altamente degradado.

Palabras clave

Levaduras secas inactivas, Proteínas, Polisacáridos.

ABSTRACT

In the past years, the wine making has experimented significant technological progress that have improved the quality and diversify their supply. Thus, the use of new oenological inputs, such as those formulated with inactive dry yeast, has experienced high demand. These products are used as enhancers of alcoholic and malolactic fermentation. Also, has been associated with significant organoleptic characteristics of wines. In spite of the relevance of these inputs, there is limited information about its composition.

The following study compared 10 products based on inactive dry yeast by chemical and physical parameters such as, absorbance measurement at 280 nm, protein detection assays on cellulose membranes, protein and polysaccharide content and electrophoretic fractionation.

According to the results obtained in this study, the commercial products based on yeasts have physical and chemical properties differential. Products are highlighted PC₁, PC₂ and PC₃, which showed high affinity with Coomassie Blue R-250 and presented a significantly higher protein content compared to other products. In regards to polysaccharide composition was highly variable between different commercial products. Moreover material detectable by Coomassie Blue protein in polyacrylamide gels corresponding to highly degraded materials.

Keywords

Inactive dry yeast, proteins, polysaccharides.

INTRODUCCIÓN

La industria del vino en Chile ha experimentado una transformación fundamental en las dos últimas décadas, debido a la innovación tecnológica y acumulación de conocimiento que ha sido parte fundamental en el desarrollo del sector vitivinícola de Chile, así como también la geografía y el clima favorable en el país (Benavente, 2006).

Frente al desarrollo actual de la industria del vino las empresas de insumos enológicos también han ampliado la gama de productos, los cuales captan cada día mayor atención entre los productores de vino. Dentro de estos productos existe una gran variedad, tales como, nuevas cepas de levaduras que ayuden a corregir defectos en los vinos, cepas de bacterias lácticas que aseguren una correcta fermentación maloláctica, nutrientes para levaduras y entre otros, distintos tipos de enzimas (Colagrande *et al.*, 1994). Uno de los productos enológicos comerciales de alta demanda corresponde a aquellos formulados a base de levaduras secas inactivas.

Estos productos enológicos son producidos a partir de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas en medios concentrados y ricos en azúcares e inactivadas por métodos enzimáticos ó térmicos (Pozo-Bayon *et al.*, 2009). Así, dependiendo del tratamiento empleado durante su fabricación pueden clasificarse en: 1) autolisados de levaduras, los cuales se elaboran a partir de inactivación térmica e incubación para que las enzimas de la levadura sean liberadas de las vacuolas y se permita degradar parte del contenido intracelular; 2) paredes o cortezas de levaduras, son productos insolubles y están formados exclusivamente por las paredes de levadura sin su contenido citoplasmático; 3) extractos de levadura, que es el extracto soluble que se obtiene tras la degradación total del contenido citoplasmático y 4) levaduras inactivas, se obtienen por inactivación térmica y posterior secado (Pozo-Bayon *et al.*, 2009). En algunos casos, estos productos comerciales también contienen o son mezclados con enzimas β -glucanasas, ya que pueden ayudar a la hidrólisis de la pared celular y en la liberación de sus componentes (Masino *et al.*, 2008).

Estos productos enológicos poseen amplias aplicaciones durante la vinificación, la cual dependerá exclusivamente de su composición. Actualmente se les utiliza como potenciadores de la fermentación alcohólica y maloláctica (Feuillat, 2001), como agentes protectores para mejorar la rehidratación de la levadura (Dulau *et al.*, 2004), así como potenciadores de las características organolépticas y estabilizadores del color en los vinos (Caridi, 2007; Comuzzo *et al.*, 2006; Pozo-Bayon *et al.*, 2009).

El uso de estas preparaciones como potenciadores de la fermentación se basa en dos mecanismos de acción diferentes. El primero estaría relacionado con un efecto protector durante la rehidratación de levadura seca activa (Dulau *et al.*, 2004), mientras que el segundo estaría vinculado a su capacidad de servir como nutriente durante la fermentación.

Es interesante mencionar que uno de los usos más comunes de estos productos en la actualidad estaría relacionado con potenciar o corregir características sensoriales del vino. Así, algunos de estos productos estarían formulados específicamente para reducir el fenómeno de oxidación en los vinos blancos, debido a la alta concentración de glutatión (Vaimakis y Roussis, 1996).

Uno de los aspectos sensoriales de alta notoriedad en el vino es el color. Según Escot *et al.*, (2001), la estabilidad del color en los vinos tintos se ve favorecida en presencia de polisacáridos, ya que estos actuarían como coloides protectores evitando la precipitación de los antocianos y taninos, lo que ayudaría a mantener la estabilidad de color. Los principales polisacáridos liberados por las levaduras durante la fermentación alcohólica son las manoproteínas (Doco *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2003). Mediante este mismo mecanismo, las manoproteínas actuarían evitando la interacción entre taninos y proteínas salivales impidiendo que se produzca la sensación de astringencia, mejorando así la sensación de volumen en boca en los vinos (Feuillat, 2001; Riou *et al.*, 2002).

Se ha observado que la composición de estos productos es altamente variable. No obstante, la mayoría se compone de levadura inactivada, metabolitos liberados en la autólisis de la levadura (aminoácidos, péptidos, proteínas, polisacáridos, nucleótidos y ácidos grasos), paredes de levadura, vitaminas, minerales y manoproteínas (Pozo-Bayon *et al.*, 2009; Caridi, 2006; Lopez, 2010; Vuchot *et al.*, 2008). Las manoproteínas son uno de los principales constituyentes de las paredes de *Saccharomyces cerevisiae* (25-50% peso seco) y representan el 35% del total de polisacáridos del vino (Vidal *et al.*, 2003). Su peso molecular varía entre los 20 kDa y 450 kDa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) y están compuestas principalmente de polisacáridos (70-80%) y proteínas (20-30%), donde sus azúcares principales son la manosa (91%) y la glucosa (2%) (Guadalupe *et al.*, 2008).

A pesar de la alta relevancia y uso de los productos comerciales formulados a base de levaduras secas inactivas de uso enológico, la información correspondiente a su composición química es escasa. Más aún, existe limitada información acerca de su composición proteica y habitualmente sólo se dispone de la entregada por los proveedores. Así, la alta diversidad composicional de estos productos comerciales hace hoy necesaria una caracterización de ellos que incluya información útil para su uso focalizado en vinificación.

Objetivo

Caracterizar y comparar productos comerciales a base de levaduras secas inactivas de uso enológico presentes en el mercado nacional mediante parámetros físicos, químicos y electroforéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Supramolecular del Programa de Biología Celular y Molecular-ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Materiales

Productos comerciales (PCs) a base de levaduras secas inactivas

Para la realización del estudio se utilizaron 10 productos comerciales a base de levaduras secas inactivas de uso enológico. Estos corresponden a productos sólidos, solubles en agua, según declara el proveedor respectivo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Información y rotulación de los productos comerciales.

Rotulación	Nombre Comercial	Proveedor
PC ₁	Red Style	Lallemand
PC ₂	Booster Rouge	Lallemand
PC ₃	Opti Red	Lallemand
PC ₄	Opti White	Lallemand
PC ₅	Booster Blanc	Lallemand
PC ₆	Noblesse	Lallemand
PC ₇	White Style	Lallemand
PC ₈	Vin' Style	Lallemand
PC ₉	Biolees	Partner
PC ₁₀	Surli Velvet	Enartis

Reactivos, materiales y equipamiento

En este estudio se utilizó una balanza analítica modelo Mettler® H31AR y una centrífuga Sorvall® MC-12V Du Pont. Para la detección de proteínas sobre membranas de celulosa se empleó papel Whatman N° 1. Para la cuantificación de proteínas y polisacáridos se utilizó un espectrofotómetro modelo UV-1700 Pharma Spec®, Shimadzu. Todos los reactivos y

estándares utilizados fueron obtenidos en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. El reactivo de Bradford (1X, lote 0972C231) fue adquirido en Winkler Ltda., Santiago, Chile.

Para llevar a cabo las electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se usó una cámara vertical SE 600 y una fuente de poder HSI-PS1500 Hoefer Scientific Instruments. Los reactivos utilizados fueron: Acrilamida, Bis-acrilamida, Tris-hidroximetil amino metano (Tris), dodecilsulfato sódico (SDS), N.N.N'.N'-tetrametil-etano-1,2-diamino (TEMED), persulfato de amonio y 2-mercaptoetanol. Todos ellos fueron adquiridos en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. Como estándares de peso molecular, se utilizaron las proteínas presentes en un perfil polipeptídico de saliva de ratón (cepa A/Snell), previamente caracterizados (López *et al.*, 2003). Para la tinción de los geles de poliacrilamida y de las proteínas en las membranas de celulosa se utilizó el colorante Coomassie Blue R-250, obtenido en Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.

Metodologías

Tratamientos y Diseño Experimental

El estudio comprendió 4 ensayos independientes entre sí con 10 tratamientos cada uno y 3 repeticiones. La unidad experimental corresponde a 20 mL de muestra a una concentración de 10 mg/mL.

Procedimiento

Los distintos productos enológicos fueron preparados de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Para ello, las muestras fueron disueltas a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada a 35°C con agitación constante durante 10 minutos. Paralelamente, los distintos productos comerciales también fueron disueltos en una solución hidroalcohólica (12% v/v). Las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf a -4 °C hasta el día de su empleo.

Variables a medir

Ensayos de solubilidad. En un primer ensayo, cada tubo Eppendorf con la muestra correspondiente, fue agitado vigorosamente (vortex) durante 30 segundos. Una alícuota de 15 µL de cada muestra fue depositada sobre un punto de una membrana de celulosa dispuesta horizontalmente a 5 cm de la superficie del mesón. Una vez que las muestras difundieron libremente sobre la membrana de celulosa, fueron dejadas secar espontáneamente a temperatura ambiente. Una vez secas, las membranas de celulosa fueron procesadas para la detección de la distribución del material proteico de acuerdo a lo descrito previamente (López *et al.*, 2007; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b; Obreque-Slier *et al.*, 2010c). Así, las muestras fueron fijadas en la membrana con

ácido tricloroacético (TCA) 5% durante 5 minutos, lavadas con etanol 80% por 5 minutos y teñidas con Coomassie blue por 20 minutos. Finalmente, la membrana de celulosa fue lavado tres veces con ácido acético 7% v/v y una vez con agua destilada, por 30 segundos. En un ensayo complementario, cada tubo Eppendorf fue centrifugado a 600 G por 5 minutos. A partir de cada sobrenadante, se obtuvo una alícuota de 15 μL para ser depositada sobre la membrana de celulosa. Esta fue procesada de acuerdo al procedimiento descrito más arriba. El área (cm^2) y la intensidad azul (píxeles/ cm^2) de las zonas de difusión de la proteína sobre la membrana de celulosa fueron medidas mediante el programa Image J (Versión 1.45S).

Medición de absorbancia a 280 nm. Las diferentes muestras fueron diluidas a una concentración nominal de 0,5 mg de sólido/mL y sometidas a lectura espectrofotométrica a 280 nm (Stoscheck, 1990).

Contenido de proteínas. Se utilizó el método propuesto por Bradford (1976). Para ello se colocaron 50 μL de cada muestra (1 mg/mL) en un tubo de ensayo, a los que se agregó 1 mL de reactivo de Bradford. Luego de 3 minutos se midió la absorbancia a 595nm. El estándar utilizado correspondió a una solución de BSA (150 $\mu\text{g/mL}$).

Contenido de polisacáridos. Se utilizó el método propuesto por Dubois *et al.*, (1956). Para ello, se disolvieron 150 mg del producto comercial en 100 mL de agua destilada. Esta solución stock fue diluida en una proporción de 1/100 con agua destilada (solución de trabajo). Paralelamente, se preparó una solución de fenol 5% en agua destilada y una solución de manosa 100 mg/mL, también en agua destilada (estándar de referencia).

Se mezclaron 200 μL de la solución de trabajo de cada muestra con 200 μL de la solución fenólica y luego con 1 mL de ácido sulfúrico puro. Luego de 1 minuto de agitación en un vortex, los tubos se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Las muestras fueron enfriadas rápidamente en hielo y luego dejadas a temperatura ambiente. A cada muestra se le midió la absorbancia a 490 nm.

Fraccionamiento electroforético de los productos comerciales. Los 10 productos comerciales fueron sometidos a electroforesis en geles laminares de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970). Para el análisis electroforético de los productos PC₁, PC₂ y PC₃ se utilizaron soluciones frescas (10 mg/mL) de los productos respectivos, preparadas en agua destilada a 35 °C y agitación constante por 15 minutos. Para el análisis electroforético de los productos PC₄, PC₅, PC₆, PC₇, PC₈, PC₉ y PC₁₀, las muestras frescas fueron preparadas de la misma manera mencionada anteriormente, luego fueron precipitadas con acetona en una razón de volumen 1:1 y centrifugadas posteriormente, luego el sobrenadante se eliminó y el precipitado fue re-suspendido en agua (20 μL). El análisis de los productos PC₁, PC₂ y PC₃ se hizo en geles de poliacrilamida 12%, mientras que para las muestras PC₄, PC₅, PC₆, PC₇, PC₈, PC₉ y PC₁₀, el análisis se hizo en geles de poliacrilamida 13%.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados y comparados mediante análisis de varianza (ANDEVA) utilizando para esto Minitab 16® Statistical Software. De observarse diferencias significativas entre las muestras, se realizaron pruebas de rango múltiple de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Ensayos de detección de proteínas sobre membranas de celulosa

Ensayo de difusión. La **Figura 1** muestra los resultados del ensayo de detección de proteínas sobre membranas de celulosa al que se sometió a los 10 productos comerciales basados en levaduras secas inactivas que fueron disueltos en agua. Una alícuota de 15 μL de cada muestra fue colocada sobre un punto de una membrana celulosa, la que fue procesada según lo señalado en Materiales y Métodos para la detección de proteínas mediante un colorante selectivo (Coomassie Blue R-250).

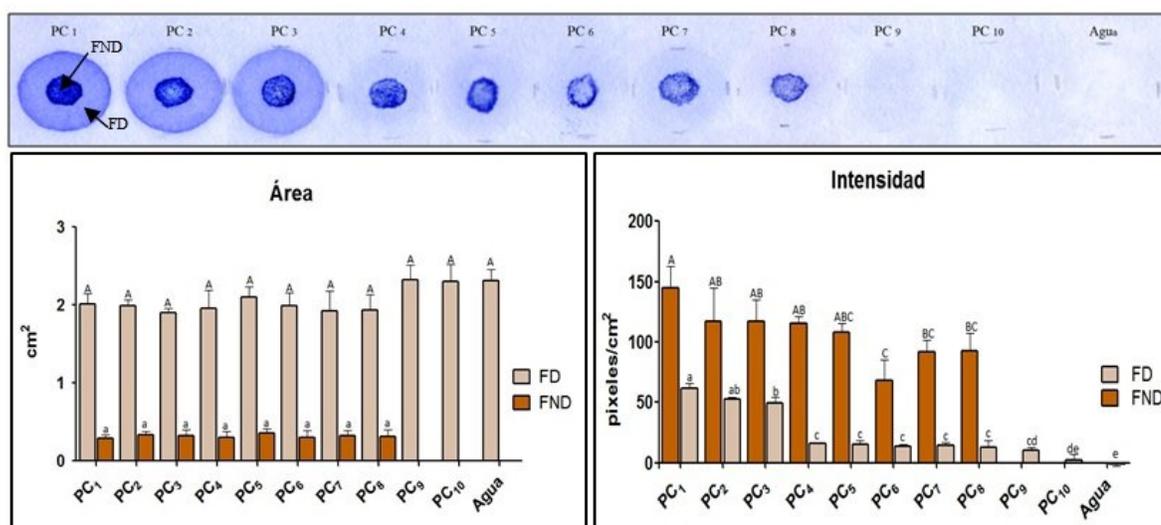


Figura 1. Ensayo de difusión de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en agua. El color azul deriva de la reactividad del material de las levaduras depositado puntualmente sobre una membrana de celulosa. Nótese en cada círculo de difusión las marcas de grafito que indican el límite de difusión de la suspensión del material de cada muestra (Área de difusión total). Tanto las áreas de difusión como las intensidades de tinción fueron determinadas mediante aplicación de programa Image J. Letras diferentes en sentido horizontal indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Las muestras PC₁ a PC₈ presentaron un modo bifásico de difusión, es decir, el material reactivo con el colorante de proteínas se distribuyó entre dos zonas claramente distinguibles: una fracción difusible (FD) y una fracción no difusible (FND). La FND quedó representada por la zona central más oscura, en torno al punto en que se depositó la muestra, mientras que la FD correspondió a la zona más clara que se distribuyó alrededor de la FND (Figura 1, PC₁). Notablemente, las muestras PC₉ y PC₁₀, en contraste a todas las demás, no presentaron reactividad frente al colorante de proteínas.

Por otro lado, en todas aquellas muestras en las que fue posible observar las fracciones FD y FND, éstas presentaron un área estadísticamente similar. No obstante lo anterior, la intensidad de tinción del área de difusión permitió mostrar claras diferencias entre las fracciones de cada producto. Por ejemplo, las intensidades del área difusible (FD) de las muestras PC₁ a PC₃ fueron mayores que las del resto de los productos, mientras que las muestras PC₉ y PC₁₀ no presentaron reactividad de ningún tipo frente al colorante. En las muestras PC₄ a PC₈ predominó la fracción no difusible.

Ensayo de precipitación. La **Figura 2** muestra los resultados del ensayo de precipitación de los 10 productos comerciales a base de levaduras secas inactivas disueltas (suspendidas) en agua. Tras la centrifugación, una alícuota de 15 µL de cada una de las muestras fue colocada puntualmente sobre las membranas celulósicas y procesadas de acuerdo a lo descrito anteriormente.

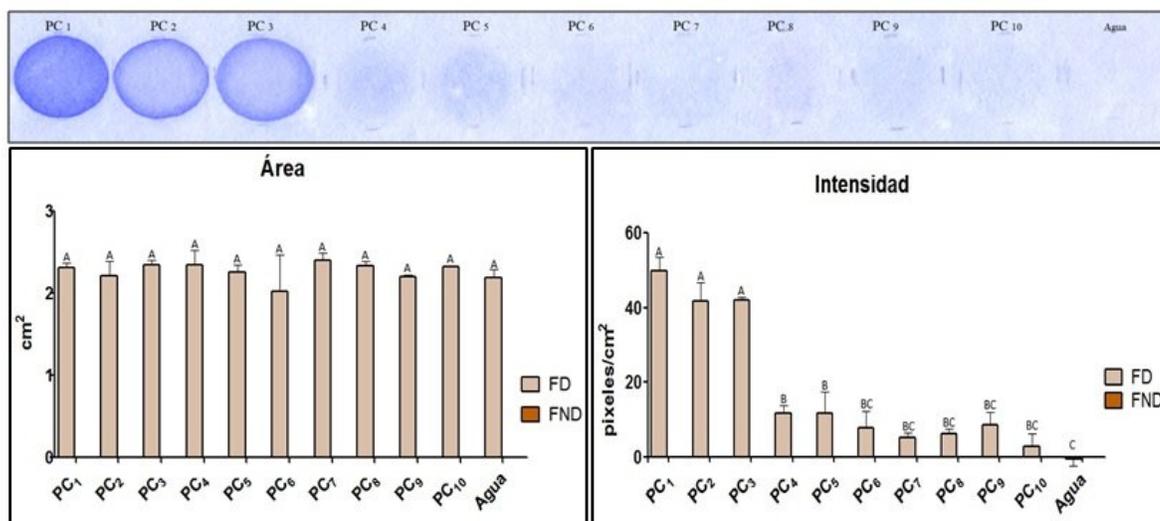


Figura 2. Ensayo de precipitación de los productos en base a levaduras secas inactivas disueltos en agua. Ver leyenda Figura 1.

Cuando las muestras fueron fijadas y teñidas con el colorante Coomassie Blue sobre la membrana de celulosa, en la totalidad de los círculos de difusión se pudo observar una difusión homogénea y radial, con una ausencia evidente de la FND, es decir, el material no difusible observado en el ensayo anterior corresponde a material insoluble y sedimentable por centrifugación.

En cuanto al área de difusión de las muestras, independientemente de la intensidad de la tinción con Coomassie Blue, no se observó diferencias estadísticas entre las muestras. Por contraste, las diferencias observadas entre las intensidades de tinción del área de difusión fueron significativas. Las muestras PC₁ a PC₃ presentaron una intensidad mucho más alta que el resto de las muestras.

Ensayos de detección de proteínas sobre membranas de celulosa (en solución hidroalcohólica).

Ensayo de difusión. En la **Figura 3** se muestran los resultados de las pruebas de difusión de los productos comerciales a base de levaduras secas inactivas disueltas o suspendidas en una solución hidroalcohólica.

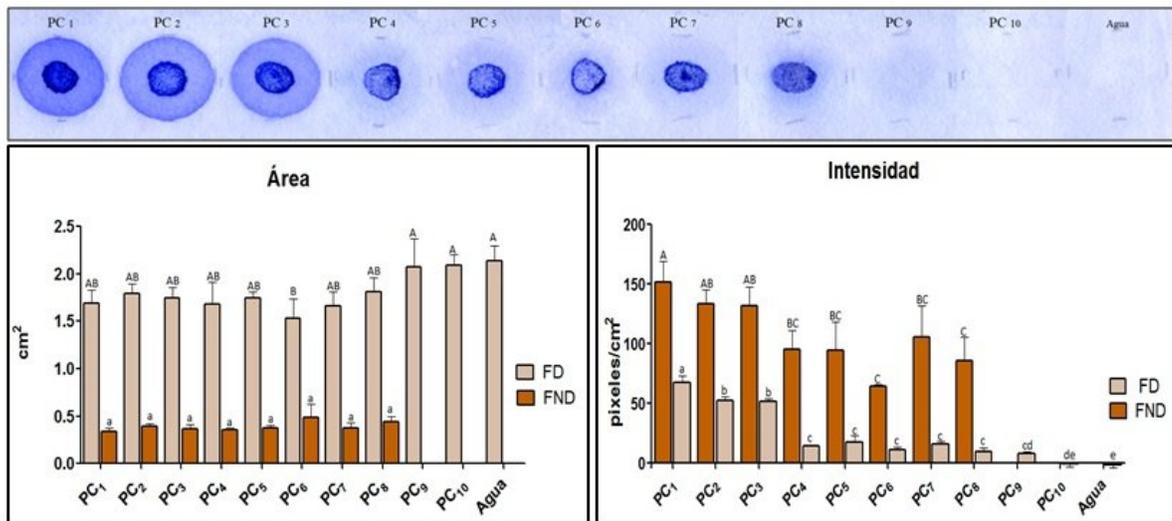


Figura 3. Ensayo de difusión de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en una solución hidroalcohólica. Ver leyenda Figura 1

Las muestras PC₁ a PC₈ presentaron un modo bifásico de difusión, mientras que las muestras PC₉ y PC₁₀ prácticamente no se tiñeron y difundieron homogéneamente en una sola fase. El área de la FD de las muestras PC₉ y PC₁₀ fue estadísticamente mayor que la de PC₆, mientras que el área de la FND fue similar en todas las muestras.

En cuanto a la intensidad del área de difusión, se apreció diferencias estadísticamente significativas entre ambas fracciones. Así, las muestras PC₁ a PC₃ presentaron una intensidad del área de las FD y FND significativamente mayor que las muestras PC₄ a PC₈. Las intensidades de PC₉ y PC₁₀ fueron prácticamente despreciables.

Ensayo de precipitación. En la **Figura 4** se muestran los resultados del ensayo de precipitación de los 10 productos comerciales a base de levaduras secas inactivas disueltos en una solución hidroalcohólica. Luego de la centrifugación, colocación y procesamiento de las muestras, se pudo observar que todas ellas presentaron una difusión homogénea sobre la membrana de celulosa.

La centrifugación provocó la desaparición de las fracciones FND en todas las muestras en que se las había podido apreciar en el ensayo de difusión, es decir, en este medio

hidroalcohólico también la fracción FND correspondió a material sedimentable o insoluble. El área de difusión de todas las muestras fue similar.

Las muestras PC₁ a PC₃ presentaron lejos las intensidades de tinción más altas, en contraste con una muy tenue y homogénea tinción azul observada en las áreas de difusión de las demás muestras.

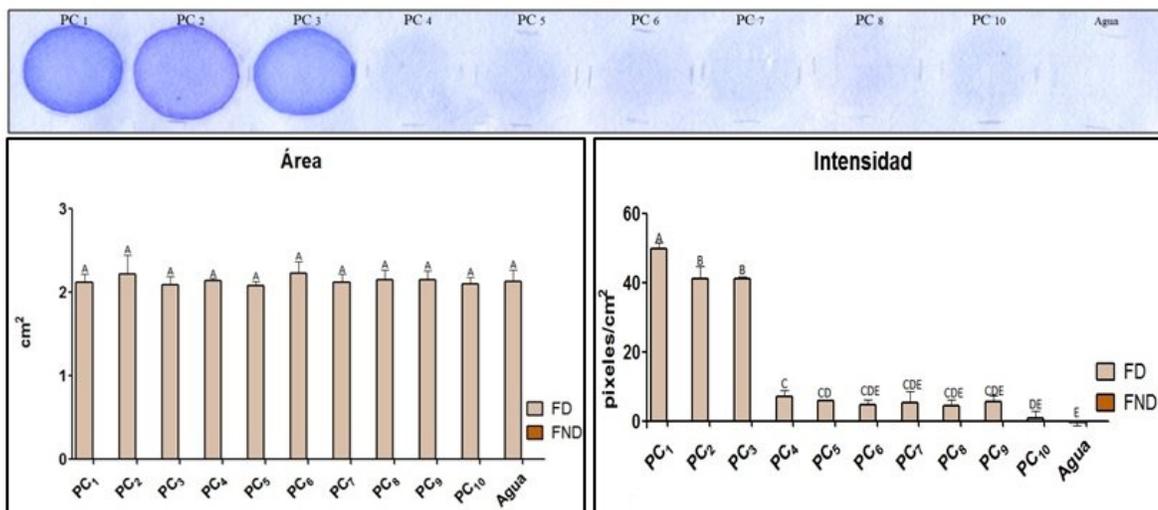


Figura 4. Ensayo de precipitación de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en una solución hidroalcohólica. Ver leyenda figura 1

Caracterización física y química de las muestras de levaduras

Cuadro 2. Valores de absorbancia, contenido de proteínas y polisacáridos de los 10 productos comerciales.

	ABS 280 nm*	Bradford **	Polisacáridos ***
PC ₁	0,668 ± 0,083 a	13,324 ± 1,436 a	39,798 ± 3,581 b
PC ₂	0,631 ± 0,060 a	13,164 ± 1,423 ab	37,375 ± 3,655 b
PC ₃	0,643 ± 0,190 a	11,717 ± 1,380 b	23,606 ± 2,909 c
PC ₄	0,202 ± 0,045 cd	5,148 ± 0,649 cd	16,722 ± 1,907 d
PC ₅	0,185 ± 0,032 cd	3,891 ± 0,436 de	41,802 ± 4,127 b
PC ₆	0,146 ± 0,024 d	2,392 ± 0,276 f	18,464 ± 1,762 cd
PC ₇	0,194 ± 0,037 cd	5,411 ± 0,691 c	19,249 ± 2,599 cd
PC ₈	0,234 ± 0,034 c	2,485 ± 0,354 ef	22,072 ± 2,853 cd
PC ₉	0,232 ± 0,025 c	4,789 ± 0,527 cd	37,027 ± 3,265 b
PC ₁₀	0,482 ± 0,057 b	5,164 ± 0,682 cd	53,532 ± 5,770 a

Cada valor corresponde al promedio ± desviación estándar. *Unidades de absorbancia; **g eq BSA/kg de producto; ***g- eq Manosa/ kg de producto. Letras diferentes en sentido vertical indican diferencia estadística (p<0.05).

El **Cuadro 2** muestra los valores de absorbancia a 280 nm, contenido de proteínas y polisacáridos de los 10 productos comerciales a base de levaduras secas inactivas. En cuanto a los valores de absorbancia, se pudo observar que variaron entre 0,20 y 0,67 Unidades de absorbancia. Así, las muestras PC₁, PC₂ y PC₃ presentaron los valores más altos, mientras que PC₄, PC₅, PC₆ y PC₇ los valores más bajos. Por su parte, el contenido de proteínas varió entre 2,39 y 13,32 g equivalentes de BSA/kg de producto, siendo los PC₁, PC₂ y PC₃ los que presentaron mayores contenidos. Por su parte, el contenido de polisacáridos varió entre 16,72 y 53,53 g equivalentes de manosa/kg de producto. Así, las muestras PC₄, PC₆, PC₇ y PC₈ presentaron las concentraciones más bajas, mientras que la muestra PC₁₀ presentó el mayor contenido de polisacáridos.

Electroforesis

Cada uno de los productos comerciales a base de levaduras fue sometido a un fraccionamiento en geles convencionales de poliacrilamida-SDS. Esta metodología permite separar a las proteínas de acuerdo a su peso molecular de manera que las proteínas más pequeñas migran más rápidamente que las proteínas de mayor peso molecular. Las condiciones empleadas permiten separar apropiadamente proteínas cuyos tamaños están en el rango 120 kDa-20 kDa. La detección de las proteínas se hizo mediante la tinción de los geles de separación mediante el colorante selectivo para proteínas Coomassie Blue R-250.

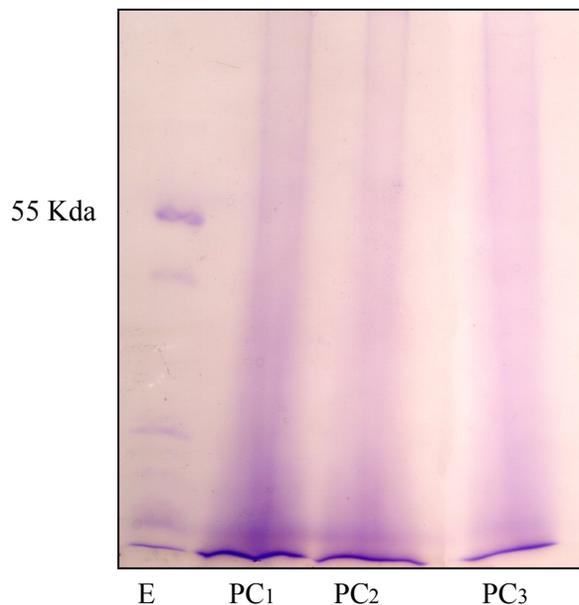


Figura 5. SDS-PAGE de productos comerciales en base a levaduras secas inactivas PC₁, PC₂ y PC₃.

La **Figura 5** muestra el resultado típico de la tinción de un gel en el que se separó alícuotas de las muestras PC₁, PC₂ y PC₃. A manera de referencia se separó en paralelo una muestra de saliva de ratón (cepa A/Snell), fluido biológico en el que predomina la proteína α -amilasa cuyo peso molecular es 55 kDa. En contraste con la muestra salival en la que se observó el duplete de bandas de α -amilasa, las muestras de levaduras comerciales presentaron una tinción difusa sin bandas evidentes a lo largo de todas las vías de separación. La intensidad de esta tinción difusa fue creciente hacia la zona del gel en la que se encontrarían los especímenes proteicos de más alta movilidad electroforética. Sólo cerca del frente de migración de las tres muestras se vislumbró la presencia de una banda electroforética de un tamaño estimado de 20 kDa. Por el contrario, en el frente de migración de las tres muestras se pudo apreciar una marcada tinción que correspondería a un material de muy bajo peso molecular. Este material bien podría corresponder a productos de degradación proteica.

En la **Figura 6** se muestra el resultado del mismo fraccionamiento electroforético al que se sometió a las muestras PC₄ a PC₁₀. En estas muestras también se observó una ausencia casi completa de bandeos electroforéticos a lo largo de los carriles de separación y la presencia, en mayor o menor medida, de material de degradación en el frente de migración. Las muestras PC₅, PC₆ y PC₈ presentaron unas bandas electroforéticas apenas visibles correspondientes a tamaños algo superiores a 55 kDa.

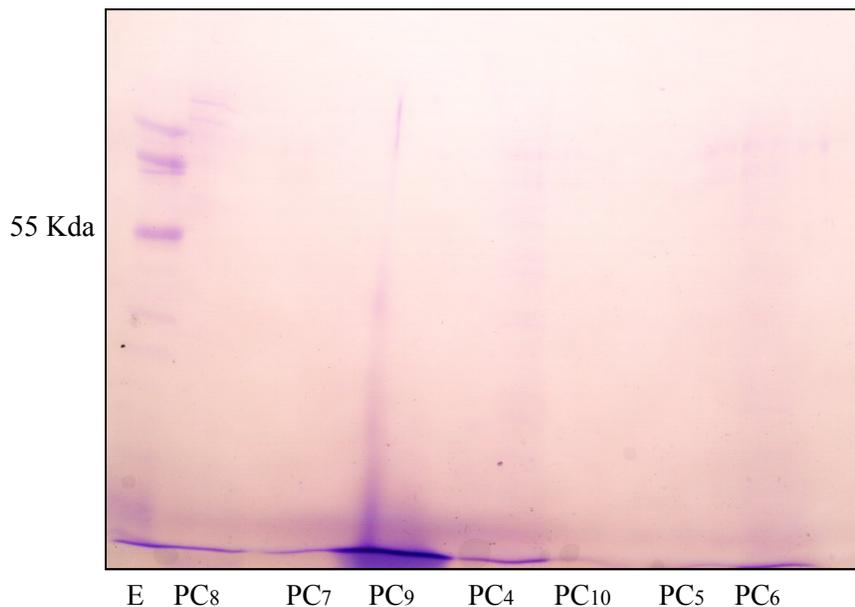


Figura 6. SDS-PAGE de las muestras de manoproteínas PC₄, PC₅, PC₆, PC₇, PC₈, PC₉ y PC₁₀.

DISCUSIÓN

En los últimos años, la elaboración del vino ha experimentado notables avances tecnológicos que han permitido mejorar su calidad y diversificar la oferta de los mismos. En este ámbito, ha tenido una importancia fundamental la aparición de nuevos productos enológicos, tales como enzimas, levaduras seleccionadas y productos mejoradores de las características sensoriales, como es el caso de las levaduras secas inactivas. Estas últimas han sido escasamente estudiadas y existe limitada información acerca de su composición (Pozo-Bayon *et al.*, 2009). En este estudio, se compararon 10 productos basados en levaduras secas inactivas, a los cuales se les sometió a ensayos químicos y físicos.

En los ensayos de reactividad de las muestras con un colorante selectivo para proteínas (Coomassie Blue R-250) sobre membranas de celulosa se observó que, tres de las diez muestras presentaron una significativa reactividad, cinco presentaron una reactividad intermedia y dos muestras no presentaron reactividad. Esta sola observación indica que al menos desde un punto de vista fisicoquímico entre los productos comerciales analizados existen tipos de materiales claramente distintos.

Cuando se evaluó el modo de difusión del material teñible con Coomassie blue dispuesto sobre las membranas de celulosa como alícuotas de soluciones de concentraciones equivalentes de los diez productos comerciales nuevamente se observó tres subconjuntos de materiales, a saber: a) Productos con un modo bifásico de difusión del material teñible, es decir, productos que exhiben una fracción difusible (FD) y una fracción no difusible (FND). A este grupo pertenecen los productos PC₁, PC₂ y PC₃. b) Productos con predominancia de material teñible no difusible, al cual pertenecen los productos PC₄, PC₅, PC₆, PC₇ y PC₈ y, c) Productos sin material teñible con Coomassie blue, como fue el caso de los productos PC₉ y PC₁₀.

Cuando los productos comerciales disueltos en agua fueron centrifugados a baja velocidad durante un tiempo breve inmediatamente antes de la colocación de alícuotas de los sobrenadantes sobre las membranas de celulosa, se observó sin excepción la desaparición de las fracciones no difusibles. Esta observación demostró inequívocamente que la fracción no difusible de todos estos productos comerciales corresponde a material sedimentable a baja velocidad, es decir, a material insoluble. En otras palabras, todos los productos comerciales contienen principalmente materiales insolubles en agua, con la excepción de las muestras PC₁, PC₂ y PC₃ que, además, contienen una fracción importante de material afín por el colorante de proteínas que es soluble en agua.

Durante la vinificación, los productos comerciales bajo análisis quedan sometidos normalmente a un medio hidroalcohólico. En nuestro estudio los productos comerciales fueron ensayados no solo en solución/suspensión acuosa sino también en un medio consistente en etanol 12%, a fin de usar condiciones más comparables a las que se encuentran en un vino. Se observó que el alcohol no afectó significativamente los modos de

difusión de los productos comerciales sobre membranas de celulosa ni indujo la precipitación de componentes de estos productos comerciales. En otras palabras, tanto los modos de difusión como las propiedades de sedimentación de los componentes de los productos comerciales a base de levaduras fueron similares cuando el medio de solución/suspensión eran agua o etanol 12%.

Otras determinaciones llevadas a cabo para comparar los productos comerciales a base de levaduras consistieron en el empleo de métodos que se emplean rutinariamente para cuantificar contenidos de proteínas. Estos fueron la determinación espectrofotométrica a 280 nm y el método de Bradford. En ambos métodos, los productos PC₁, PC₂ y PC₃ presentaron los valores más altos, observación coincidente con la mayor intensidad de tinción con Coomassie Blue sobre las membranas de celulosa en los ensayos de difusión. Tomadas en conjunto, estas observaciones indicarían que los componentes de los productos comerciales PC₁, PC₂ y PC₃ poseen en comparación con los demás productos comerciales, una mayor cantidad de componentes químicos con anillos aromáticos, como las proteínas (Goldring, 2012), así como, de acuerdo a Bradford, una mayor concentración de material proteico.

La cuantificación de polisacáridos mediante la medición espectrofotométrica a 490 nm de la reacción entre fenol con carbohidratos, en medio ácido mostró variaciones importantes entre los distintos productos. El contenido promedio de las muestras fue de 30,96 g equivalentes de manosa/kg de producto. Según Del Barrio-Galán *et al.*, (2012) los principales residuos de monosacáridos que forman parte de estos productos comerciales son glucosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa y, en algunos casos, pequeñas cantidades de apiosa y ramnosa. La muestra PC₁₀ presentó el mayor contenido de polisacáridos. Como se había indicado antes, esta muestra presentó un contenido medio de proteínas. Conjugadas, ambas observaciones sugieren que en la muestra PC₁₀ las proteínas están más glicosiladas que en otros productos analizados. De esta manera, las muestras que exhibieron en nuestro estudio el mayor contenido de proteínas (PC₁, PC₂ y PC₃) estarían menos glicosiladas.

Un último análisis realizado consistió en someter a un fraccionamiento electroforético convencional a los 10 productos comerciales. Una observación general fue la notable escasez o ausencia completa de bandas polipeptídicas en los productos analizados. Los productos PC₅, PC₆ y PC₈ fueron los únicos en los que se logró identificar algunas bandas electroforéticas (polipéptidos) ligeramente perceptibles. Una observación también común en este estudio fue la presencia de material intensamente teñido en el frente de avance de la mayoría de las muestras en el gel. El procedimiento electroforético empleado incluía la presencia del detergente SDS (dodecilsulfato de sodio). En este procedimiento particular, los componentes de las muestras (proteínas) interactúan con el SDS, organizan micelas mixtas (proteínas más SDS), adquieren una carga negativa y migran hacia el ánodo. La velocidad de migración, y por ende la migración, dependen casi exclusivamente del tamaño de las proteínas. Por este motivo, las proteínas más pequeñas migran más rápido, o bien migran más, que las proteínas de mayor tamaño molecular. Por este motivo, como en el fraccionamiento de las muestras comerciales se observó una tinción intensa en la región del gel de electroforesis cercana al frente de migración, entonces se puede concluir que los

materiales presentes en las muestras eran de muy bajo tamaño molecular. Probablemente, las proteínas de las muestras presentaron un alto grado de degradación debido, por ejemplo, a la actividad de proteasas, o algún otro agente proteolítico, en alguna etapa de la preparación del producto comercial consistente en levaduras inactivas o material de levaduras inactivas. Distintos tratamientos utilizados en la inactivación, como altas temperaturas o empleo de enzimas, provocan la fragmentación de las proteínas presentes en los productos finales. Tales fragmentos pueden tener distintos tamaños cuya extensión puede representar la correspondiente a unas pocas decenas de residuos de aminoácidos. Los escasos aminoácidos que podrían haberse formado, por su bajo tamaño, no son retenidos por el gel de electroforesis durante el fraccionamiento.

Sin embargo, si bien es altamente posible que la fragmentación de las proteínas de las levaduras pueda explicar la reactividad del colorante de proteínas en la región próxima al frente de migración, no es descartable como explicación alternativa el que las proteínas presentes en los productos comerciales no sean detectables por el colorante de proteínas. Este fenómeno se ha observado con proteínas altamente glicosiladas, cuya afinidad por el colorante de proteínas Coomassie Blue R-250 es menor. Sin embargo, sería altamente improbable que todas las proteínas de un microorganismo o restos de un microorganismo estén altamente glicosiladas. De hecho, en nuestras observaciones hemos apreciado que habría distintos grados de glicosilación entre los distintos productos comerciales en función de las distintas relaciones entre contenido de carbohidratos por unidad másica de proteínas. Una manera de probar o descartar esta posibilidad sería proceder a la tinción de los geles de electroforesis con colorantes o métodos más selectivos para glicoproteínas.

De todos modos, el conjunto de ensayos realizados señalan con claridad que hay diferencias muy marcadas en la composición de las denominadas levaduras secas inactivas de uso enológico. En consecuencia, estos materiales podrían afectar diferencialmente también las propiedades (sensoriales) de los vinos que los contienen. Por ello, este estudio comparativo preliminar sobre estos insumos enológicos, y sus observaciones principales, fortalecen el interés por profundizar en el conocimiento de las diferencias que exhiben distintos productos cuyo empleo se hace bajo el solo conocimiento de un nombre genérico y un muy exiguo respaldo documental sobre la composición de los mismos de parte de las empresas proveedoras.

CONCLUSIONES

Los productos comerciales a base de levaduras utilizadas en este estudio poseen propiedades físicas diferenciales. Así, las muestras PC₁, PC₂ y PC₃, presentaron un modo bifásico de difusión, con fracciones difusible y no difusible teñibles intensamente con el colorante Coomassie Blue R-250, mientras que otros productos presentan principalmente material no difusible (PC₄ a PC₈) o bien ausencia de ambos componentes (PC₉ y PC₁₀). En todas las muestras, el material no difusible es de un tamaño mayor pues puede ser separado por centrifugación a baja velocidad

Los productos comerciales a base de levaduras utilizadas en este estudio poseen propiedades químicas diferenciales. Así, las muestras PC₁, PC₂ y PC₃, presentaron un contenido significativamente mayor de proteínas (absorciometría 280 nm y contenido Bradford-BSA) en comparación al resto de los productos evaluados (PC₄ a PC₁₀). La composición de polisacáridos (Método de fenol-Dubois) fue altamente variable entre los distintos productos comerciales.

El material proteico detectable por Coomassie Blue en geles de poliacrilamida corresponde a material proteico altamente degradado.

BIBLIOGRAFÍA

Benavente, J.M. 2006. Wine production in Chile. In: Chandra, V. (Ed.), *Technology, Adaptation and exports: How some developing countries got it right*. The World Bank, Washington, DC, pp. 225-242

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

Caridi, A. 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 417-422

Caridi, A. 2007. New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal Food Microbiology* 120: 167-172

Colagrande O., A. Silva, M.D. Fumi. 1994. Recent applications of biotechnology in wine productions. *Biotechnology Progress* 10: 2-18

Comuzzo, P., L. Tat, A. Tonizzo and F. Battistutta. 2006. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chemistry* 99: 217-230

Del Barrio-Galan, R., S. Perez-Magarino, M. Ortega-Heras, Z. Guadalupe and B. Ayestaran. 2012. Polysaccharide characterization of commercial dry yeast preparations and their effect on white and red wine composition. *Food Science and Technology* 48: 215-223

Doco, T., J.M. Brillouet and M. Moutounet. 1996. Evolution of grape (Carignan noir cv) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 108-110

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry* 28: 350-356

Dulau, L. A., A. Ortiz-Julien and G. Trioli. 28 de Octubre 2004. Method for dry yeast rehydration and rehydration medium. International patent PCT/FR02/01949. United States: [s.I.]. 7 de Junio 2002. 12 p.

Escot, S., M. Feuillat, L. Dulau and C. Charpentier. 2001. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7: 153-159

- Feuillat, M. 2001. Nouveaux adjuvants oenologiques possibles d'origine levurienne. *Bulletin de l' O.I.V.* 74: 753–771
- Goldring, J.P. 2012. Protein quantification methods to determine protein concentration prior to electrophoresis. *Methods in Molecular Biology* 869: 29-35
- Guadalupe Z., A. Palacios and B. Ayestarán. 2008. Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9022-9029
- Klis, F.M., P. Mol, K. Hellingwerf and S. Brul. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies* 26: 239 -256
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-688
- López, R.O., M. Puente, I. Morales, U. Kemmerling and F. Díaz. 2003. Early detection in saliva of polypeptides associated to isoproterenol-induced mouse parotid hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1621: 41-47
- López, J., J. Castillo, L. Traipe and R. López. 2007. A protein dry-binding assay on cellulose membranes for tear protein quantification. Use of conventional Schirmer strips. *Cornea* 26: 970-976
- López, E. 2010. El papel de las Manoproteínas. *Agrovin, S.A. (Enero/Marzo)*. Disponible: http://www.agrovin.com/agrv/pdf/documentacion/articulos/manoproteinas_elaboracion_vinos_calidad.pdf. Leído el 18 de Mayo de 2012
- Masino, F., G. Montevecchi, G. Arfelli and A. Antonelli. 2008. Evaluation of the combined effects of enzymatic treatment and aging on lees on the aroma of wine from Bombino bianco grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9495–9501
- Obreque-Slier, E., C. Mateluna, A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010a. Quantitative determination of interactions between tannic acid and a model protein using diffusion and precipitation assays on cellulose membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8375–8379
- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010b. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3729–3735
- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora, J. Da Silva and O. Laureano. 2010c. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere

and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3591–3599.

Pozo-Bayon, M. A., I. Andujar-Ortiz and M. V. Moreno-Arribas. 2009. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. *Food Research International* 42: 754–761

Ribéreau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Donéche and A. Lonvaud. 2000. *Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, LTD, Chichester –NewYork – Weinheim – Brisbane – Singapore –Toronto

Riou, V., A. Vernhet, T. Doco and M. Moutounet. 2002. Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 16: 17-23

Stoscheck, C.M. 1990. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69

Vaimakis V. and I. G. Roussis. 1996. Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chemistry* 57: 419–422

Vidal S., P. Williams, T. Doco, M. Moutounet and P. Pellerin. 2003. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 54: 439-447

Vuchot, P., S. Vidal, C. Riou, C. Bajard-Sparrow, C. Fauveau and P. Pellerin. 2008. Le mannoprotéines levuriennes: La réalité au-delà du mythe. *Revue des œnologues* 177: 27-30

APÉNDICE I

Cuadro 3. Valores de área e intensidad colorante ensayo de difusión de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en agua.

	Ensayo Difusión			
	Área (cm²)		Intensidad (píxeles/ cm²)	
	FND	FD	FND	FD
PC₁	0,3 ± 0,0 a	2,0 ± 0,1 a	144,6 ± 17,6 a	62,0 ± 3,5 a
PC₂	0,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,0 a	117,1 ± 27,7 ab	53,0 ± 1,5 ab
PC₃	0,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,0 a	116,9 ± 18,2 ab	49,6 ± 4,5 b
PC₄	0,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,2 a	115,3 ± 5,7 ab	15,9 ± 1,2 c
PC₅	0,3 ± 0,0 a	2,0 ± 0,1 a	108,1 ± 6,9 abc	15,4 ± 3,1 c
PC₆	0,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,1 a	68,4 ± 16,5 c	13,7 ± 1,7 c
PC₇	0,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,2 a	92,2 ± 9,15 bc	14,3 ± 2,4 c
PC₈	0,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,2 a	92,2 ± 15,3 bc	12,6 ± 5,9 c
PC₉	ND	2,3 ± 0,1 a	ND	10,4 ± 2,2 cd
PC₁₀	ND	2,2 ± 0,2 a	ND	2,4 ± 4,8 de
Agua	ND	2,3 ± 0,1 a	ND	1,1 ± 1,1 e

*Letras diferentes en sentido vertical indican diferencia estadística (p<0,05). ND: No detectado

Cuadro 4. Valores de área e intensidad colorante ensayo de precipitación de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en agua.

	Ensayo precipitación			
	Área (cm²)		Intensidad (píxeles/cm²)	
	FND	FD	FND	FD
PC₁	ND	2,3 ± 0,0 a	ND	49,8 ± 3,6 a
PC₂	ND	2,2 ± 0,1 a	ND	41,7 ± 5,0 a
PC₃	ND	2,3 ± 0,0 a	ND	41,9 ± 0,8 a
PC₄	ND	2,3 ± 0,1 a	ND	11,7 ± 1,9 b
PC₅	ND	2,2 ± 0,0 a	ND	11,7 ± 5,5 b
PC₆	ND	2,4 ± 0,0 a	ND	7,6 ± 4,5 bc
PC₇	ND	2,3 ± 0,0 a	ND	5,1 ± 1,2 bc
PC₈	ND	2,1 ± 0,0 a	ND	6,2 ± 1,3 bc
PC₉	ND	2,0 ± 0,0 a	ND	8,6 ± 3,1bc
PC₁₀	ND	2,3 ± 0,0 a	ND	2,8 ± 3,2 bc
Agua	ND	2,1 ± 0,1 a	ND	0,6 ± 1,8 c

*Letras diferentes en sentido vertical indican diferencia estadística (p<0,05). ND: No detectado

APÉNDICE II

Cuadro 5. Valores de área e intensidad colorante ensayo de difusión de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en solución hidroalcohólica.

	Ensayo Difusión			
	Área (cm²)		Intensidad (píxeles/cm²)	
	FND	FD	FND	FD
PC₁	0,3 ± 0,4 a	1,6 ± 0,7 ab	151,9 ± 17,0 a	67,8 ± 5,5 a
PC₂	0,3 ± 0,4 a	1,7 ± 0,8 ab	133,6 ± 11,7 ab	52,7 ± 3,0 b
PC₃	0,3 ± 0,3 a	1,7 ± 0,8 ab	131,7 ± 16,1 ab	52,1 ± 1,8 b
PC₄	0,3 ± 0,4 a	1,6 ± 0,9 ab	95,2 ± 15,8 bc	14,2 ± 1,1 c
PC₅	0,3 ± 0,3 a	1,7 ± 0,8 ab	94,7 ± 24,0 bc	17,3 ± 5,6 c
PC₆	0,4 ± 0,1 a	1,5 ± 0,7 b	64,1 ± 1,9 c	11,6 ± 1,6 c
PC₇	0,3 ± 0,3 a	1,6 ± 0,7 ab	105,7 ± 26,1 bc	16,0 ± 2,7 c
PC₈	0,4 ± 0,2 a	1,8 ± 0,8 ab	85,7 ± 19,9 c	9,4 ± 3,4 c
PC₉	ND	2,0 ± 0,2 a	ND	8,3 ± 1,3 cd
PC₁₀	ND	2,0 ± 0,3 a	ND	0,4 ± 2,7 de
Agua	ND	2,1 ± 0,2 a	ND	1,4 ± 1,9 e

*Letras diferentes en sentido vertical indican diferencia estadística (p<0,05). ND: No detectado

Cuadro 6. Valores de área e intensidad colorante ensayo de precipitación de los productos a base de levaduras secas inactivas disueltos en solución hidroalcohólica.

	Ensayo precipitación			
	Área (cm²)		Intensidad (píxeles/cm²)	
	FND	FD	FND	FD
PC₁	ND	2,1 ± 0,5 a	ND	49,7 ± 8,7 a
PC₂	ND	2,2 ± 0,6 a	ND	41,2 ± 7,4 b
PC₃	ND	2,0 ± 0,5 a	ND	41,0 ± 6,3 b
PC₄	ND	2,1 ± 0,4 a	ND	7,0 ± 1,7 c
PC₅	ND	2,0 ± 0,5 a	ND	5,8 ± 2,5 cd
PC₆	ND	2,2 ± 0,6 a	ND	4,8 ± 3,4 cde
PC₇	ND	2,1 ± 0,6 a	ND	5,1 ± 3,3 cde
PC₈	ND	2,1 ± 0,5 a	ND	4,4 ± 1,7 cde
PC₉	ND	2,1 ± 0,4 a	ND	5,5 ± 2,0 cde
PC₁₀	ND	2,1 ± 0,4 a	ND	0,8 ± 2,1 de
Agua	ND	2,1 ± 0,4 a	ND	0,3 ± 0,6 e

*Letras diferentes en sentido vertical indican diferencia estadística (p<0,05). ND: No detectado